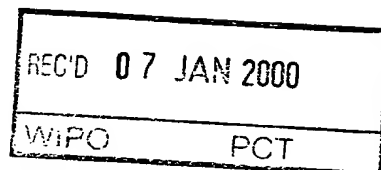


ES99/3FR

OFICINA ESPAÑOLA

de

**PATENTES y MARCAS****CERTIFICADO OFICIAL**


Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 9802465, presentada en este Organismo, con fecha 24 de Noviembre de 1998.

Madrid, 20 de diciembre de 1999

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

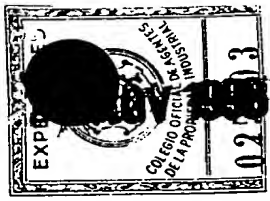
P.D.

M. MADRUGA



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



P.- 99.151

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

INSTANCIA DE SOLICITUD DE:

☒ PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD

NUMERO SOLICITUD P9802465
FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN O.E.P.M. '98 NOV 24 12:14
FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(1) <input type="checkbox"/> SOLICITUD DE ADICION <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACION SOLICITUD EUROPEA	(2) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN MODALIDAD NUMERO SOLICITUD FECHA SOLICITUD MODALIDAD NUMERO SOLICITUD FECHA SOLICITUD
--	--

(3) LUGAR DE PRESENTACION	CODIGO
---------------------------	--------

(4) SOLICITANTE(S)	APELLIDOS O DENOMINACION JURIDICA
INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE NAVARRA, S.A.	

NOMBRE	DNI
--------	-----

(5) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE
DOMICILIO Avenida Pío XII, 53
CALIDAD Pamplona
PROVINCIA Navarra
PAIS RESIDENCIA España
NACIONALIDAD Española

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Dpto. SECRETARIA GENERAL
REPROGRAFIA
Panamá, 1 - Madrid 28071

(6) INVENTOR(ES)	(7) <input type="checkbox"/> EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR <input checked="" type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O UNICO INVENTOR	(8) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO <input type="checkbox"/> INVENC. LABORAL <input checked="" type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION	
APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD	COD. NACION
1) EZQUERRO SAENZ	Ignacio José	Española	ES
2) LASARTE SAGASTIBELZA	Juan José	"	ES

(9) TITULO DE LA INVENCION
"PEPTIDOS INHIBIDORES DE TGFβ1"

(10) INVENCION REFERENTE A PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO SEGUN ART. 25.2 L.P.	<input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO
--	--

(11) EXPOSICIONES OFICIALES
LUGAR FECHA

(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAIS DE ORIGEN	COD. PAIS	NUMERO	FECHA

(13) EL SOLICITANTE SE ACOGE A LA EXENCION DE PAGO DE TASAS PREVISTA EN EL ART. 162 L.P.	<input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO
--	--

(14) REPRESENTANTE	APELLIDOS ELZABURU MARQUEZ	NOMBRE Alberto	CODIGO 1232(1)
DOMICILIO Miguel Angel, 21	LOCALIDAD MADRID	PROVINCIA MADRID	COD. POSTAL 28010

(15) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN	
<input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCION. N.º DE PAGINAS... 47 <input checked="" type="checkbox"/> REIVINDICACIONES. N.º DE PAGINAS... 2 <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS. N.º DE PAGINAS... 28 <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD	<input checked="" type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACION <input type="checkbox"/> PRUEBAS <input checked="" type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS <input checked="" type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS <input checked="" type="checkbox"/> OTROS

FIRMA DEL FUNCIONARIO

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE
Alberto de Elzaburu

(16) NOTIFICACION DE PAGO DE LA TASA DE CONCESION
Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 10-10-86.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS



PATENTE

RESUMEN Y GRAFICO

NUMERO DE SOLICITUD
P9802465
FECHA DE PRESENTACION
24.11.1998 98 NOV 24 12:14

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

Péptidos sintéticos antagonistas, obtenidos de TGF β 1 o de sus receptores en el organismo, que pueden ser utilizados en la fabricación, tanto por sí solos, como las secuencias génicas que los codifican y los sistemas recombinantes que los expresen, en la fabricación de composiciones útiles para el tratamiento de enfermedades hepáticas y más concretamente en casos de fibrosis. Dichas composiciones pueden incluir opcionalmente mimotopos de dichos péptidos activos.

GRAFICO



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

HOJA INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS

NUMERO DE SOLICITUD

P9802465

FECHA DE PRESENTACION

24-11-1998

'98 NOV 24 12:14

☒ PATENTE DE INVENCION☐ MODELO DE UTILIDAD

(4) SOLICITANTES	APELLIDOS O RAZON SOCIAL	NOMBRE	DNI
(6) INVENTORES	APELLIDOS	NOMBRE	NAC.
3) PRIETO VALTUEÑA 4) BORRAS CUESTA		Jesús Francisco	ES ES
(11) EXPOSICIONES OFICIALES			
LUGAR:		FECHA:	
(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAIS DE ORIGEN	CODIGO	NUMERO	FECHA



DATOS DE PRIORIDAD

(31) NÚMERO

(32) FECHA

(33) PAÍS

A 1

(12) PATENTE DE INVENCIO

(21) NÚMERO DE SOLICITUD

(22) FECHA DE PRESENTACIÓN
24--11-1998

(71) SOLICITANTE(S)

INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO
DE NAVARRA, S.A.

NACIONALIDAD española

DOMICILIO

Avenida Pío XII, 53, 31008 Pamplona, Navarra, España

(72) INVENTOR(ES)

1) IGNACIO JOSE EZQUERRO SAENZ, 2) JUAN JOSE LASARTE SAGASTIBELZA,
3) JESUS PRIETO VALTUEÑA y 4) FRANCISCO BORRAS CUESTA

(73) TITULAR(ES)

(11) N° DE PUBLICACIÓN

(45) FECHA DE PUBLICACIÓN

(62) PATENTE DE LA QUE
ES DIVISIONARIA

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

(51) Int. Cl.

(54) TÍTULO

"PEPTIDOS INHIBIDORES DE TGF β 1"

(57) RESUMEN (APORTACIÓN VOLUNTARIA, SIN VALOR JURÍDICO)

Péptidos sintéticos antagonistas, obtenidos de TGF β 1 o de sus receptores en el organismo, que pueden ser utilizados en la fabricación, tanto por sí solos, como las secuencias génicas que los codifican y los sistemas recombinantes que los expresen, en la fabricación de composiciones útiles para el tratamiento de enfermedades hepáticas y más concretamente en casos de fibrosis. Dichas composiciones pueden incluir opcionalmente mimotopos de dichos péptidos activos.

"PEPTIDOS INHIBIDORES DE TGF β 1"

DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

5 El control del crecimiento celular está regulado por diferentes proteínas del grupo de los factores de crecimiento (Schalch DS y col (1979) Endocrinology 104:1143-1151). Entre los factores de crecimiento más importantes implicados en el desarrollo celular, capaces de actuar de
10 forma autocrina y paracrina, se encuentran los factores transformantes del crecimiento (TGF, del inglés *Transforming Growth Factor*) (Braun L. y col. (1988) Cell Biol 85:1539-1543; Lyons RM y Moses HL (1990) Eur. J. Biochem. 187:467-473).

15 El término TGF se utilizó, por primera vez, para describir la actividad producida por una línea celular transformada con el virus del sarcoma murino (deLarco JE y Todaro GJ (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75:4001-4005; Mizel SB y col. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77:2205-2208). El
20 sobrenadante de estas células fue capaz de inducir el normal crecimiento, en agar blando, de células que necesitan un soporte sólido para crecer. Estudios más específicos pusieron en evidencia dos clases de TGF, que se denominaron TGF α y TGF β , que a su vez abarcan a familias de proteínas
25 relacionadas. La familia del TGF β está formada por 5 isoformas (Brand T. y Schneider MD (1995) J. Mol. Cell Cardiol. 27:5-18) de estructura dimérica (Schlunneger MP y Grutter MG (1992) Nature 358:430-434; Brand T. y Schneider MD (1995) J. Mol. Cell Cardiol. 27:5-18). Estudios de las
30 proteínas maduras, purificadas a partir de una misma especie, han demostrado un alto grado de identidad entre sus secuencias (Tabla 1).

Tabla 1. Homología entre los diferentes tipos de TGF β s. TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 procedente de humanos, TGF β 4 procedente
35 de pollo y TGF β 5 procedente de rana. (Roberts AB y Sporn MB, 1990).

%	de	TGFβ1	TGFβ2	TGFβ3	TGFβ4	TGFβ5
TGFβ1		100				
TGFβ2		71	100			
TGFβ3		72	76	100		
TGFβ4		82	64	71	100	
TGFβ5		76	66	69	72	100

El TGFβ1 se sintetiza como un precursor de 390 amino-ácidos denominado Pre-Pro-TGFβ1. En una primera hidrólisis se produce la liberación de un fragmento hidrófobo de 29 aminoácidos, que da lugar al Pro-TGFβ1. Posteriormente se libera el TGFβ1 maduro mediante otro corte en una región que precede al extremo amino del TGFβ1 y que consta de dos argininas, dando lugar a una proteína de 112 aminoácidos con un peso molecular de 12 kDa. Para dar lugar a la forma biológicamente activa, dos de estos monómeros se unen entre sí por medio de puentes disulfuro, obteniéndose un dímero de 25 kDa. Las modificaciones de esta estructura provocan la pérdida de la función biológica (Barnard JA y col. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1032:79-87).

Se conoce la existencia de varios dominios dentro de la estructura del TGFβ1, uno de estos dominios se encuentra localizado entre los aminoácidos 40 y 82 y está implicado en la unión del TGFβ1 a sus receptores celulares (Quian SW y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89:6290-6294; Burmester JK y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:8628-8632).

Receptores del TGFβ1 y otras proteínas de unión

• Se han caracterizado cinco tipos de receptores específicos para el TGFβ1 (Cheifetz S y col. (1988) J. Biol. Chem. 263:17225-17228 y López Casillas F. y col. (1991) Cell 67:785-795). Estos receptores tienen distintas afinidades para los diferentes tipos de TGFβ1. Los receptores tipo I,

II y III son los más conocidos hasta el momento (revisado en Attisano L y col (1994) Biochim. Biophys. Acta 1222:71-80; Derynck R. (1994) Trends Biochem. Sci. 19:548-553; Yingling y col. (1995) Biochim. Biophys. Acta 1242:115-136). También se han descrito los receptores de tipo IV (MacKay K. y Danielpour D. (1991) J. Biol. Chem. 266:9907-9911) y de tipo V (Ichijo H. y col. (1991) J. Biol. Chem. 266:22459-22464). Se ha descrito también que los dominios transmembrana y citoplas-máticos de la endoglina (Cheifetz S y col. (1992) J. Biol. Chem. 267:19027-19030; Bellón T. y col. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2340-2345; Yamashita y col. (1995) J. Biol. Chem. 269:1995-2001; Zhang H. y col. (1996) J. Immunol. 156:564-573)) tiene alrededor de un 70% de analogía con los receptores de tipo III tanto humano como de rata.

El RIII sería el encargado de unir el $TGF\beta 1$ y presentarlo a RII que a su vez formaría un complejo con RI (Yamashita y col. (1994) J. Biol. Chem. 269:20172-20178) o a complejos en los que varias moléculas de RI se asocian con el RII (Weiss G. y Massagué J. (1996) EMBO J 15:276-289). La interacción RII-RI provocaría la fosforilación de RI y la posterior activación de su serin/treonin quinasa la que fosforilaría a segundos mensajeros como las proteínas MADR2 (Macías-Silva M y col., (1996) Cell 87:1215-1224).

25 *Papel del $TGF\beta 1$ en la diferenciación y regeneración hepática*

Los efectos producidos son distintos dependiendo del momento del desarrollo y del tipo celular.

30 . Aumento de la matriz extracelular, al actuar sobre las células estelares hepáticas (células de Ito), principal fuente de proteínas de la matriz (Mustoe TA y col. (1987) Science 237:1333-1336).

. Diferenciación de las células epiteliales a hepatocitos

35 (Florini JR y col. (1986) J. Biol. Chem. 261:16509-16513).



- . Inhibición del crecimiento celular durante el proceso de regeneración hepática. Este efecto es de gran importancia en el mantenimiento del reposo celular *in vivo* (Kato Y y col (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:9552-9556).
- 5 . Inhibición de la endocitosis del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGF) como se ha podido observar en cultivos de hepatocitos fetales de rata (Noda M. y Rodan GA (1987) J. Cell Physiol. 133:426-437).
- 10 *Papel del TGF β 1 en la fibrosis hepática*

El TGF β 1 se ha visto asociado a los procesos de fibrosis hepática (Czaja MJ y col. (1989) J. Cell Biol. 108:2477-2482; Annoni G. y col. (1992) J. Hepatol 14:259-
15 264) provocando un aumento de la producción de las proteínas de la matriz extracelular, por las células estelares hepáticas (lipocitos o células de Ito), de sus receptores e inhibiendo la síntesis de las enzimas proteolíticas que degradan la matriz (Ignotz RA y Massagué J. (1986) J. Biol.
20 Chem. 261:4337-4345). En el hígado el TGF β 1 induce la síntesis de colágeno y fibronectina en las células estelares hepáticas (Weiner FR (1990) Hepatology 11:111-117). También existe una autorregulación aumentando su propia síntesis, mediante la inducción de su ARNm.

25 El TGF β 1 también se ve implicado en el aumento de la síntesis de la α 2-Macroglobulina sintetizada por los hepatocitos y las células estelares hepáticas activadas. Mediante la unión al TGF β 1 y provocando su inactivación (Bachem MG (1994) Ann NY Acad. Sci. 737:421-424) la α 2-
30 Macroglobulina eliminaría el TGF β 1 de los compartimentos extracelulares.

El estudio de pacientes afectados por un daño hepático crónico ha mostrado que existe una correlación entre la expresión del TGF β 1 y la expresión del ARNm para el pro-
35 colágeno tipo I y los niveles séricos de péptido tipo III

THIS PAGE BLANK (USPTO)

del procolágeno (Castilla A. y col. (1991) N. Engl. J. Med. 324:933-940).

Los pacientes con cirrosis hepática tienen una expectativa de vida mas corta de lo normal debido a las complicaciones que aparecen en el curso de la enfermedad, como la hipertensión portal o la insuficiencia hepática.

Efecto del TGF β 1 sobre la matriz extracelular

10 La interacción del TGF β 1 con los receptores celulares provoca:

- . Activación de la síntesis de procolágeno, fibronectina (Ignotz RA y col. (1987) J. Biol. Chem. 262:6443-6446) y proteínas relacionadas, entre las que encontramos proteínas de membrana capaces de interactuar con los componentes de la matriz extracelular (Carter WG (1982) J. Biol. Chem. 257:13805-13815).
- . Inhibición de la síntesis de enzimas proteolíticas capaces de degradar la matriz (Fukamizu H. y Grinnell F. (1990) Exp. Cell Res. 190:276-282).
- . Estimulación de la síntesis de inhibidores de enzimas proteolíticas (Fukamizu H. y Grinnell F. (1990) Exp. Cell Res. 190:276-282).

Todo esto induce un aumento de las interacciones de la célula con la matriz extracelular, que junto a la mayor reorganización de las proteínas que la componen, da lugar a un aumento en la cantidad total de matriz extracelular (Roberts CJ y col. (1988) J. Biol. Chem. 263:4586-4592). Estas evidencias confirman la implicación del TGF β 1 en procesos de cicatrización (Fukamizu H. y Grinnell F. (1990) Exp. Cell Res. 190:276-282; Barnard JA y col. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1032:79-87).

35 *Péptidos como inhibidores de la interacción ligando receptor*

Existe la posibilidad de utilizar pequeñas moléculas, péptidos sintéticos, como análogos de moléculas existentes en el organismo, con el fin de emular su función. Estudios realizados por LeSateur y col demuestran la posibilidad de
5 usar análogos ciclados del factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *Nerve Growth Factor*), emulando la región de giro β , permitiendo su unión al receptor (LeSateur L. y col. (1996) *Nature Biotechnology* 14:1120-1122). También es posible utilizar péptidos como antagonistas de estas mo-
10 léculas, evitando que el factor nativo interaccione con su receptor por un bloqueo mediado por el péptido (Lasarte JJ y col. (1994) *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes* 7:129-134; LeSateur y col. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:6564-6569). Estudios anteriores han demostrado la utilidad de
15 los péptidos sintéticos como inhibidores de la interacción ligando-receptor incluso en el caso de que el epitopo de reconocimiento no sea continuo (Daniels AJ y col. (1995) *Mol. Pharmacol.* 48:425-432). Otros estudios realizados con el receptor tipo II del TGF β 1 y con la fetuina, una glico-
20 proteína del grupo de receptores tipo II, han demostrado la posibilidad de usar péptidos ciclados como inhibidores de la interacción del TGF β 1 con el RII (Demetriou M. y col. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:12755-12761). Con esta ciclación se consigue obtener péptidos con una estructura similar a
25 la que se podría dar *in vivo*.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Por las razones indicadas más arriba, pensamos que
30 péptidos procedentes tanto del TGF β 1 como de sus receptores, o de proteínas con capacidad de unión al TGF β 1, podrían ser inhibidores de la acción del TGF β 1. Por lo que decidimos explorar esta posibilidad.

35 *Elección de los péptidos a sintetizar*

La elección de los péptidos a sintetizar se realizó de diferente manera según provinieran del TGF β 1 o de sus receptores.

5 En el caso de la secuencia del TGF β 1 se sintetizaron péptidos de 15 aminoácidos que abarcaron toda la secuencia del TGF β 1. Cada péptido tenía 10 aminoácidos en común con sus dos vecinos inmediatos.

10 En el caso de las secuencias de sus receptores, los péptidos se eligieron en base a programas informáticos diseñados en nuestro laboratorio. Uno de estos programas permite comparar dos secuencias aminoacídicas entre sí, con el fin de predecir zonas parcialmente complementarias. Tam-
15 bién se utilizaron otros programas capaces de predecir las zonas de las proteínas que se encontrarían más expuestas, en base a la hidrofobicidad e hidrofiliicidad de los amino-
ácidos que componen su secuencia.

Síntesis de Péptidos

20 Los péptidos se sintetizaron mediante el método de fase sólida (Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-54), utilizando fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc) como grupo protector temporal del grupo alfa-amino (Atherton et al. (1989) Journal of Chemical Society Perkins Transactions 1: 538-546.). Para la síntesis de pequeñas cantidades de un
25 gran número de péptidos se utilizó un sintetizador múltiple que permite la síntesis simultánea de 96 péptidos (Borrás-Cuesta et al. (1991) Biologicals 19: 187-190). Los péptidos
30 se conservaron a -80°C al estado sólido hasta su utilización.

Purificación de los péptidos por HPLC

35 Los péptidos sintetizados se analizaron y purificaron mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), uti-

lizando un sistema Waters 600E-900 (Millipore Corp., Bedford, Estados Unidos).

Para el análisis de los péptidos, por HPLC analítico, se utilizó una columna Waters Radial-Pak™ C₁₈ 300 Å 15 µm, 8x100mm (Millipore Corp., Bedford, Estados Unidos). El péptido se disolvió en una solución de TFA 0,1% en agua destilada, a una concentración máxima de 1 mg/ml. La solución de péptido se inyectó (100µl) en la columna y se eluyó en un gradiente de agua/acetonitrilo (Figura 15) (Romil Ltd., Cambridge, Estados Unidos) ambos con 0,1% TFA a un flujo de 1 ml/minuto. Las fracciones que contenían el péptido se detectaron por su absorbancia a 220 nm y 280 nm (photo diode array detector, waters 991, Millipore Corp., Bedford, Estados Unidos).

Para su purificación se utilizó una columna Waters Delta-Pak™ C₁₈ 300 Å 15 µm, 25x100mm (Millipore Corp., Bedford, Estados Unidos). El péptido se disolvió y se inyectó (2 ml) en las mismas condiciones que en el caso anterior, utilizándose el mismo gradiente a un flujo de 5 ml/min. La fracción que contenía el péptido puro se recogió en un matraz.

EXPERIMENTACIÓN IN VITRO. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LOS PÉPTIDOS

25

Líneas celulares

Se utilizó una línea procedente de epitelio de pulmón de visón, MV-1-Lu (CCL-64, American Type Cell Culture, Virginia, Estados Unidos). Las células se cultivaron en frascos de cultivo de 162 cm² (Costar Corporation, Cambridge, Estados Unidos) en una estufa a 37°C y 5% de CO₂, hasta alcanzar la subconfluencia. Se utilizó un medio completo: RPMI 1640 con L-glutamina (GibcoBRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Escocia) suplementado con un 5% de suero de ternera fetal (FCS, Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel), HEPES 10 mM (HEPES Buffer 1M, Bio-

Whittaker, Verviers, Belgica) y antibióticos (penicilina 100U/ml y estreptomicina 100 µg/ml).

5 *Ensayo de inhibición del crecimiento de la línea celular MV-1-Lu*

Las células Mv-1-Lu crecidas tal y como se indica más arriba, se despegaron del fondo de los frascos de cultivo utilizando 5 ml de tripsina-EDTA (*Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel*), se resuspendieron en medio completo y se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 8 minutos. Tras la centrifugación las células se resuspendieron en medio completo a una concentración de 50000 células/ml. Para la realización del ensayo se tomaron 10 ml de la suspensión de células y se dispensaron a placas de 96 pocillos de fondo plano (*Costar Corporation, Cambridge, Estados Unidos*) añadiendo 100 µl/pocillo, y se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% de CO₂, lo que permite la adhesión de las células al fondo de los pocillos. Una vez transcurrido este tiempo se añadieron los péptidos a ensayar en RPMI, a una concentración final de 200 µg/ml en presencia de una concentración de 200 pg/ml de TGFβ1 en RPMI (*R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, Reino Unido*). La concentración final de FCS en el pocillo fue del 2,5%. Tras 24 horas de incubación se añadió 1 µCi de timidina tritiada por pocillo ([metil-³H]-timidyne 25 Ci/mmol, *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Reino Unido*) y se incubó durante 12 horas adicionales (*Grubeck-Loebenstein B. y col. (1989) J. Clin. Invest. 83:764-770; Brennan FM y col. (1990) Clin. Exp. Immunol. 81:278-285*).

Una vez terminados los periodos de incubación las células se despegaron del fondo de los pocillos con tripsina-EDTA y se recogieron utilizando un recolector manual (*Titertek cell harvester, Skatron Instruments Inc., Sterling, Estados Unidos*) que lisa las células recogiendo el ADN en filtros de nitrocelulosa (*Filter MAT 11731, Skatron Instruments Inc., Sterling, Estados Unidos*) donde

queda fijado. Los filtros se colocaron individualmente en tubos de polipropileno de 5 ml a los que se añadió 4 ml de líquido de centelleo (*Biogreen-11*, *Reactivos Scharlau S.A.*, *Barcelona, España*). La actividad de cada tubo se cuantificó
5 durante 90 segundos en un contador de centelleo β LKB (*Beta plate system*, *LKB*, *Upssala, Suiza*).

Estudio de la inhibición de la unión del TGF β 1 a los receptores celulares

10 *Marcaje selectivo de los receptores celulares (Affinity labeling)*

Las células MV-1-Lu se despegaron de los frascos de cultivo incubándolas a 37°C durante 10 minutos, con 10 ml
15 de la solución 1 (NaCl 128 mM, KCl 5 mM, 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfonato 25 mM a pH 7,5, glucosa 5 mM y EDTA 1 mM). Las células así despegadas se resuspendieron en la solución 2 (NaCl 128 mM, KCl 5 mM, 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfonato 50 mM a pH 7,5, CaCl₂ 1,2 mM, MgSO₄
20 1,2 mM y 5 mg/ml BSA) y se recogieron por centrifugación a 1000 x g. durante 5 minutos. Tras la centrifugación las células se resuspendieron en la solución 2 a una concentración de 10⁶ células/ml.

A partir de esta suspensión celular se hicieron alícuotas de 0,5 ml en placas de 24 pocillos (*Greiner GmbH*, *Frickenhausen, Alemania*) donde se añadieron los péptidos, en 50 μ l de una solución 0,8 mg/ml, se incubaron durante 2 horas a 4°C en agitación. Posteriormente se añadió ¹²⁵I-TGF β 1 (2 μ Ci) a una concentración final de 277,2 pM (¹²⁵I-TGF β 1
25 *human recombinant 800-2200Ci/mmol*, *Amersham Life Science*, *Buckinghamshire, Reino Unido*) y se incubó durante otras dos horas a 4°C en agitación.

Tras la incubación, las células se transfirieron a un tubo de centrífuga donde se centrifugaron en frío a 12000 x
35 g. durante 1 minuto. Posteriormente se lavaron 2 veces en solución 2 fría y se resuspendieron en 0,5 ml de solución 2

fría, 5 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO 99,5%, Sigma Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos) y disuccimidil suberato (DSS, Pierce Chemical Co., Rockford, Estados Unidos) dando una concentración final 0,25 mM de DSS. La reacción se detuvo a los 15 minutos por dilución, centrifugación y lavado con una solución que contiene sacarosa 0,25M, Tris 10 mM y EDTA 1 mM a pH 7,4. El precipitado de células se resuspendió en 0,5 ml de Tritón x-100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos) 1% v/v, Tris 10 mM a pH 7,0, EDTA 1 mM, Fenilmetilsulfonil fluoruro 0,1mM, Pepsatin 1 μ g/ml y Leupeptin 1 μ g/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos) y se incubó durante 40 minutos a 4°C. La fracción insoluble en detergente se separa por centrifugación a 12000 x g. durante 15 minutos. Las fracciones solubles en detergente (sobrenadante) e insoluble (precipitado) se congelaron a -20°C (Massagué J. y Like B. (1985) J. Biol. Chem. 260:2636-2645).

Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato-sódico

Las fracciones soluble e insoluble en detergente se utilizaron para análisis electroforéticos en geles de acrilamida/bisacrilamida al 7,5% durante 5-6 horas a 220 voltios.

La tinción de las proteínas se realizó con una solución de comassie brilliant blue® R250 (Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Alemania) en metanol 50%, ácido acético 10% y agua destilada, durante 30 minutos. Los lavados posteriores se realizaron con una solución de metanol 50%, ácido acético 10% y agua destilada durante 15 minutos, en un primer lavado y metanol 2,5%, ácido acético 0,5% y agua destilada, en los siguientes lavados, hasta la eliminación del color de fondo.

Citometría de flujo

La inhibición de la unión del TGF β 1, mediada por los péptidos, a los receptores celulares se midió mediante el método de inmunofluorescencia directa. Para ello se utilizó un Kit de inmunofluorescencia (*Fluorokine rh TGF β -biotin*,
5 *R&D Systems Europe Ltd., Abingdon Reino Unido*). Este ensayo está basado en la capacidad de unión del TGF β 1 biotinilado a los receptores celulares, de forma específica y la posterior interacción de la biotina con avidina fluoresceinada; de tal forma que la intensidad de la señal dependerá de la
10 cantidad de TGF β 1 unido a los receptores celulares.

Las células MV-1-Lu crecidas en frascos de 162 cm² se despegaron utilizando la solución 1 (descrita anteriormen-
te) y se resuspendieron en suero fisiológico para su cen-
trifugación a 500 x g. durante 5 minutos. Tras la centrifu-
15 gación las células se resuspendieron de nuevo en suero fisiológico a una concentración de 4x10⁶ células/ml. Se añadieron 25 μ l de la suspensión celular a tubos de boro-silicato de 12x75 mm a los que se añadió el péptido a
ensayar en 40 μ l de medio RPMI 1640, dando una concentra-
20 ción final de 0,42 μ g/ μ l y 10 μ l de TGF β 1 biotinilado. Como control de la especificidad se añadió 10 μ l de un reactivo biotinilado suministrado por el Kit, como control positivo se añadió 10 μ l de TGF β 1 biotinilado y como control negati-
vo se añadió 20 μ l de un anticuerpo bloqueante anti-TGF β 1.
25 En todos los controles se añadió suero fisiológico hasta alcanzar un volumen total de 75 μ l. Todos los tubos se incubaron durante una hora a 4°C en oscuridad.

Transcurrido el periodo de incubación se añadió 10 μ l de avidina fluoresceinada y se incubó durante 30 minutos a
30 4°C en oscuridad, tras los que se añadió 2 ml de una solución de lavado (RDF1) y se centrifugó a 500 x g durante 6 minutos. El precipitado celular se resuspendió en 0,2 ml de PBS frío para el análisis citométrico (*FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, California, Estados Uni-*
35 *dos*). Este procedimiento permite medir la fluorescencia

emitida por cada célula al incidir sobre ella un haz de láser mediante un programa informático (*LisysTM II*, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, California, Estados Unidos). En la Figura 16 se muestra una imagen típica del análisis por citometría de flujo.

Para la obtención de los datos de inhibición de la unión del TGF β 1 a los receptores se utilizó el control positivo del ensayo para delimitar los campos correspondientes a las células marcadas, que han unido al TGF β 1-biotina, (M2) y a las células no marcadas (M1). Una vez delimitados los campos se calculó el porcentaje de células que se encontraba dentro de cada uno. Se hizo lo mismo con los datos obtenidos cuando se incubaba el péptido con TGF β 1-biotina o con las células, según fueran procedentes de los receptores o del TGF β 1 respectivamente. Con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición de cada péptido utilizando la siguiente fórmula: $100 - ((M2 \text{ Péptido} - M2 \text{ Negativo}) \times 100 / (M2 \text{ Positivo} - M2 \text{ Negativo}))$.

20 EXPERIMENTACIÓN IN VIVO. MODELO DE FIBROSIS EXPERIMENTAL

Se utilizaron ratas blancas macho (raza Wistar albina), procedentes de camadas simultáneas (5 semanas \pm 1,5 semanas), con el fin de obtener un grupo homogéneo en edad, y peso inicial. A lo largo del periodo de experimentación, los animales fueron mantenidos en condiciones de temperatura constante (22°C) y con un ciclo luz/oscuridad de 12 horas. Tuvieron libre acceso al agua y a la comida.

Se indujo cirrosis hepática (CH) mediante inhalación de tetracloruro de carbono, durante 11 semanas, dos veces por semana (López Novoa JM y col (1976) *Patología* IX:223-240; Camps J. y col. (1987) *Gastroenterology* 93:498-505). La exposición al CCl₄ se efectuó haciendo burbujear aire comprimido, a un flujo de 3 litros/minuto, a través de un

frasco lavador de gases. Se comenzó con un minuto de exposición, aumentando en un minuto por semana hasta llegar a 4 minutos en la cuarta semana. Durante la quinta semana no se administró CCl_4 , comenzando de nuevo a la sexta semana con una exposición de 5 minutos. Este tiempo de exposición se mantuvo hasta la semana 11. En el agua de bebida se añadió 400 mg/l de fenobarbital (*Luminal®*, Bayer, Leverkusen, Alemania), desde una semana antes de iniciar la exposición al CCl_4 y hasta el final del periodo de experimentación. Antes de iniciar el tratamiento se dejó una semana, en la que no se les administró CCl_4 . Durante el tratamiento se les administró una dosis semanal de CCl_4 , como recuerdo (Figura 2).

Distribución de los animales

Los animales se distribuyeron en 4 grupos antes de iniciarse el proceso de inducción de la cirrosis hepática. *Controles Sanos (Co)*: Animales que no fueron sometidos al proceso de fibrosis.

Controles Sanos tratados (Co+P144): Animales que no fueron sometidos al proceso de fibrosis y se les administró el péptido P144 durante las 3 últimas semanas (coincidiendo en el tiempo con el tratamiento del grupo de ratas Tto_2).

Controles Cirróticos 1 (Ci_1): Animales sometidos al proceso de inducción de cirrosis por inhalación de CCl_4 dos veces por semana. Estos animales se separaron en 2 grupos al llegar a la quinta semana:

Controles cirróticos 1 (Ci_1): Animales que siguieron sometidos al proceso de inducción de la fibrosis hasta la semana 11, sin administrarles el péptido P144. Se les administró suero salino en días alternos, durante todo el proceso de inducción (semanas 5 a 11).

Cirróticos Tratados 1 (Tto₁): Animales a los que se le administró el péptido P144 procedente de la secuencia del receptor tipo III, en días alternos, durante el proceso de inducción de la fibrosis, desde la semana 5 hasta la semana 11.

Controles Cirróticos 2 (Ci₂): Animales que siguieron sometidos al proceso de inducción de la fibrosis sin recibir el péptido P144 ni suero salino. Este grupo se subdividió en otros dos al llegar a la semana 11.

Controles Cirróticos 2 (Ci₂): Animales cirróticos que no fueron sometidos a ningún tipo de tratamiento, manteniéndose como controles. Estos animales recibieron inyecciones de suero salino durante 3 semanas (semanas 13 a 15).

Cirróticos Tratados 2 (Tto₂): Animales cirróticos que fueron tratados con el péptido procedente de la secuencia del receptor tipo III (P144), durante 3 semanas (semanas 13 a 15).

Tratamiento de los animales

. Grupo Tto₁: Estos animales fueron sometidos a tratamiento durante el proceso de fibrosis. El tratamiento con el péptido se inició en la quinta semana, (antes de la exposición al CCl₄ durante 5 minutos) y se continuó hasta finalizar las once semanas del proceso de inducción de cirrosis.

. Grupo Tto₂: Estos animales fueron sometidos a tratamiento después de finalizado el proceso de inducción de cirrosis (11 semanas). El tratamiento se inició una semana después de la última inhalación de CCl₄ y se continuó durante 21 días.

Antes de iniciar el tratamiento y al finalizarlo se extrajo sangre a todos los animales sometidos al tratamien-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

to con el péptido. El péptido fue administrado por inyección subcutánea, en la zona abdominal a una dosis de 70 μ g/animal en 500 μ l de suero fisiológico.

5 *Sacrificio de los animales y disección del hígado*

Finalizado el tratamiento de los animales con el péptido, tanto en el modelo con ratas como en el de ratones, se sacrificaron por decapitación, después de haberles extraído sangre del plexo retrorbital con un capilar.

Inmediatamente después se procedió a la disección del hígado y la recogida de muestras.

Se cortaron las muestras y se introdujeron en formol como solución fijadora, para su posterior análisis histológico. Otros fragmentos se introdujeron en criotubos, que tras la inmersión en nitrógeno líquido se conservaron a -80°C.

Evaluación anatomopatológica del hígado

El estudio histológico se realizó en fragmentos de hígado previamente fijados en formol durante al menos 24 horas, transcurridas las cuales se introdujeron en etanol (70%).

Tras la deshidratación se procedió a la inclusión en bloques de parafina. De los bloques obtenidos se realizaron cortes seriados de 3 μ m de espesor, empleando un microtomo de rotación Leitz y cuchillas de acero. Previamente a la tinción los cortes se desparafinaron en xilol (AnalaR, BDH, Poole, Reino Unido) durante 15 minutos, después de calentarlos a 60°C en una estufa, durante 15 minutos, y se hidrataron mediante pasos sucesivos por alcoholes de concentración decreciente 100%, 96%, 80% y 70% finalizando en agua. Se realizaron las siguientes tinciones:

Hematoxilina-Eosina.

Tricrómico de Masson (Locquin M, y Langeron, (1985) en Manual de Microscopía Ed. Labor S.A Barcelona): Utiliza un

THIS PAGE BLANK (USPTO)

colorante específico para proteínas colagénicas (verde luz).

Rojo Sirio: Tinción específica para colágeno.

5 *Confirmación de la fibrosis hepática: análisis de imagen*

Para el análisis de imagen de las muestras obtenidas se utilizó un microscopio de luz (*Olympus BH-2, Tokio, Japón*) conectado a una cámara de vídeo (*Sony DXP-950P, Sony Co., Tokio, Japón*), con la que se captaron los diferentes
10 campos de cada preparación. Se tomaron 6 campos de manera aleatoria a partir de cada preparación teñida con rojo sirio. Las diferentes imágenes captadas se analizaron por medio de un programa informático (*Visilog 4.1.5, Noesis, Orsay, Francia*) capaz de calcular el área de fibrosis y el
15 área total de la preparación. Con estos datos se calculó un índice de fibrosis (área de fibrosis/área total) de cada campo. Para poder utilizar este programa se necesitó modificar la adquisición de las imágenes mediante la utilización de filtros de luz polarizada (*Olympus U-POT, Tokio, Japón*) y de luz verde (*Olympus IF550, Tokio, Japón*) lo que
20 permitió la automatización del proceso de análisis de las muestras.

25 *Detección de colágeno en cortes de 14 μ m de tejido parafinado*

Los cortes de 14 μ m que se utilizaron para esta técnica se obtuvieron de la misma manera que los cortes de 3 μ m anteriormente mencionados. Estos cortes fueron sometidos a un proceso de desparafinización durante 12 horas en
30 xilol. Una vez eliminada la parafina, las muestras fueron hidratadas pasándolas por diferentes grados de alcohol 96%, 80%, 50%, finalizando el proceso en agua destilada.

Una vez hidratadas se sometieron a un proceso de pre-tinción en una solución de 160 mg de *Fast Green FCF* (*Fluka chemika-BioChemika, Buchs, Suiza*) en 160 ml de ácido pícrico (*Merk, Darmstadt, Alemania*) saturado durante 15 minutos
35

THIS PAGE BLANK (USPTO)

en oscuridad. Las muestras se lavaron por inmersión en agua hasta que dejaron de colorear el agua de lavado. Una vez eliminado el colorante sobrante, las muestras se tiñeron durante 30 minutos en oscuridad en una solución de 160 mg de *Direct Red 80*, (*Fluka Chemika-BioChemika Buchs, Suiza*) y 64 mg de *Fast Green*, ambos colorantes en 160 ml de ácido pícrico saturado. Se lavaron de nuevo hasta eliminar el colorante sobrante y se procedió a despegar las muestras de los portas mediante el raspado de la muestra con una espátula pequeña. Los cortes así despegados se introdujeron en diferentes tubos que contenían 3 ml de una solución de NaOH 0,1 N (*Quimón, Montplet&Esteban S.A., Barcelona, España*) y Metanol (1:1). Se tomaron alícuotas de los diferentes tubos para su lectura en el espectrofotómetro (*Lambda 2 UV/VIS spectrophotometer, Perkin-Elmer, Norwalk, Estados Unidos*) a longitudes de onda de 540 nm y 630 nm utilizándose como blanco una alícuota de la solución de NaOH 0,1 N y Metanol. (López de León A. y Rojkind (1985) *Histochem Cytochem* 33:737-743; Gaudio E. y col. (1993) *Int. J. Exp. Path.* 74:463-469).

De acuerdo a los trabajos de Gaudio E. y col. (1993) *Int. J. Exp. Path.* 74:463-469) se utilizaron las siguientes fórmulas para la obtención de las cantidades de colágeno y de proteína total:

$$\text{mg Colágeno} = \frac{\text{absorbancia a 540 nm} - \text{absorbancia a 630 nm}}{37}$$

$$\text{mg Colágeno/mg proteína total} = \frac{\text{mg Colágeno}}{\text{mg Colágeno} + \text{mg proteínas no colagénicas}}$$

$$\text{Proteínas no colagénicas} = \frac{\text{absorbancia a 630 nm}}{3}$$

Tratamiento estadístico de los resultados

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Los datos obtenidos en la experimentación *in vivo* se sometieron a análisis estadístico. La normalidad de las variables cuantitativas se comprobó mediante el ensayo de Shapiro-Wilks.

5 Debido a que los datos no se ajustaban a una distribución normal se realizó estadística no paramétrica. La comparación entre grupos se hizo mediante la H de Kruskal-Wallis seguida de la comparación de U de Mann-Whitney. Los datos se graficaron mediante cajas representándose la mediana de los datos, línea gruesa dentro de cada caja, junto
10 con el rango intercuartílico, altura de la caja, mientras que los bigotes de cada caja representan las observaciones más altas y más bajas dentro de un determinado rango intercuartílico.

15 La asociación entre variables se estudió mediante la prueba exacta de Fisher. Se realizó una regresión logística para estudiar la independencia de la asociación de estas variables.

20 Se consideró significativo el valor de P igual o menor de 0,05.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS para Windows V 6.1.3.

INHIBICIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD DEL TGFβ1

25

Ensayo de inhibición del crecimiento celular de la línea MV-1-Lu

30 El TGFβ1 es una citoquina capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de la línea celular MV-1-Lu (Grubeck-Loebenstein B. y col. (1989) J. Clin. Invest. 83:764-770; Brennan FM y col. (1990) Clin. Exp. Immunol. 81:278-285), por lo que esta línea se utilizó para ensayar el efecto
35 bloqueante de los péptidos sobre el TGFβ1. Tras diferentes combinaciones de medios, células y timidina se estudió el efecto de distintas concentraciones de TGFβ1 sobre la in-

corporación de [metil-³H] timidina, por parte de las células MV-1-Lu en cultivo, hasta determinar las condiciones más adecuadas para el ensayo. Estas condiciones se muestran en la Figura 3.

5 Una vez determinadas tanto la concentración óptima de células MV-1-Lu (5000 células/pocillo) como la menor concentración de TGFβ1 capaz de producir una inhibición de alrededor del 90% (200 pg/ml, Figura 18) se ensayó el efecto inhibitorio de los péptidos sintéticos a la concentración
10 de 200 µg/ml.

*Inhibición in vitro de la actividad del TGFβ1 mediante
péptidos sintéticos*

15 Los péptidos sintéticos potencialmente inhibidores de la actividad del TGFβ1, elegidos tal como se indica más arriba en la sección: elección de los péptidos a sintetizar (tanto los procedentes de proteínas que se unen al TGFβ1 como del propio TGFβ1) se ensayaron utilizando la línea
20 celular MV-1-Lu. Los péptidos se disolvieron en medio RPMI tamponado, libre de suero de ternera fetal y se procedió como sigue:

 Los péptidos pertenecientes a la secuencia del receptor, o complementarios a los picos de hidrofili-
25 TGFβ1, se incubaron durante 30 minutos en presencia de esta citoquina y luego se agregaron al cultivo celular. Los péptidos procedentes de la secuencia del TGFβ1 se añadieron al cultivo celular antes de la adición del TGFβ1, para que interaccionaran con los receptores de la superficie celu-
30 lar. Estas incubaciones se realizaron en 100 µl del mismo medio que el utilizado para añadir las células. Los péptidos activos permitieron el crecimiento celular en mayor o menor grado según fuera su capacidad de inhibir al TGFβ1.

Inhibición del TGFβ1 mediante péptidos procedentes del TGFβ1

En una primera etapa se sintetizaron péptidos solapados procedentes del TGFβ1. Estos péptidos (Tabla 2) se sintetizaron pensando que alguno de ellos podría unirse a los receptores celulares, impidiendo de esta manera la unión del TGFβ1 natural a estos receptores.

Tabla 2. Péptidos procedentes del TGFβ1. Se indica el número del péptido junto a su posición en la secuencia completa, así como su secuencia de aminoácidos. Por comodidad de síntesis todos los péptidos se sintetizaron con una alanina añadida en el extremo C-terminal que no se indica en la tabla.

Péptido	Secuencia
P1 ₍₂₈₀₋₂₉₃₎	AlaLeuAspThrAsnTyrCysPheSerSerThrGluLysAsn
P2 ₍₂₈₄₋₂₉₇₎	AsnTyrCysSerSerThrGluLysAsnCysCysValArg
P3 ₍₂₈₈₋₃₀₁₎	SerSerThrGluLysAsnCysCysValArgGlnLeuTyrIle
P4 ₍₂₉₄₋₃₀₇₎	CysCysValArgGlnLeuTyrIleAspPheArgLysAspLeu
P5 ₍₂₉₈₋₃₁₁₎	GlnLeuTyrIleAspPheArgLysAspLeuGlyTryLysTry
P6 ₍₃₀₂₋₃₁₅₎	AspPheArgLysAspLeuGlyTryLysTryIleHisGluPro
P7 ₍₃₀₆₋₃₁₉₎	AspLeuGlyTryLysTryIleHisGluProLysGlyTyrHis
P8 ₍₃₀₈₋₃₂₁₎	GlyTryLysTryIleHisGluProLysGlyTyrHisAlaAsn
P9 ₍₃₁₂₋₃₂₅₎	IleHisGluProLysGlyTyrHisAlaAsnPheCysLeuGly
P10 ₍₃₁₆₋₃₂₉₎	LysGlyTyrHisAlaAsnPheCysLeuGlyProCysProTyr
P11 ₍₃₁₉₋₃₃₃₎	HisAlaAsnPheCysLeuGlyProCysProTyrIleTrySerLeu
P12 ₍₃₂₂₋₃₃₅₎	PheCysLeuGlyProCysProTyrIleTrySerLeuAspThr
P13 ₍₃₂₆₋₃₃₉₎	ProCysProTyrIleTrySerLeuAspThrGlnTyrSerLys
P14 ₍₃₃₀₋₃₄₃₎	IleTrySerLeuAspThrGlnTyrSerLysValLeuAlaLeu
P15 ₍₃₃₅₋₃₄₉₎	ThrGlnTyrSerLysValLeuAlaLeuTyrAsnGlnHisAsnPro
P16 ₍₃₃₆₋₃₄₉₎	GlnTyrSerLysValLeuAlaLeuTyrAsnGlnHisAsnPro
P17 ₍₃₄₀₋₃₅₃₎	ValLeuAlaLeuTyrAsnGlnHisAsnProGlyAlaSerAla
P18 ₍₃₄₃₋₃₅₈₎	LeuTyrAsnGlnHisAsnProGlyAlaSerAlaAlaProCysCys
P19 ₍₃₄₄₋₃₅₈₎	TyrAsnGlnHisAsnProGlyAlaSerAlaAlaProCysCys
P20 ₍₃₄₈₋₃₆₀₎	AsnProGlyAlaSerAlaAlaProCysCysValProGln
P21 ₍₃₅₀₋₃₆₃₎	GlyAlaSerAlaAlaProCysCysValProGlnAlaLeuGlu
P22 ₍₃₅₄₋₃₆₇₎	AlaProCysCysValProGlnAlaLeuGluProLeuProIle
P23 ₍₃₅₈₋₃₇₁₎	ValProGlnAlaLeuGluProLeuProIleValTyrTyrVal
P24 ₍₃₆₄₋₃₇₇₎	ProLeuProIleValTyrTyrValGlyArgLysProLysVal
P25 ₍₃₆₈₋₃₈₁₎	ValTyrTyrValGlyArgLysProLysValGluGlnLeuSer
P26 ₍₃₇₂₋₃₈₅₎	GlyArgLysProLysValGluGlnLeuSerAsnMetIleVal
P27 ₍₃₇₈₋₃₉₁₎	GluGlnLeuSerAsnMetIleValArgSerCysLysCysSer

En la Figura 4 se muestra el efecto inhibitorio de los péptidos de la Tabla 6 sobre la actividad del TGF β 1. Puesto que el TGF β 1 inhibe el crecimiento de las células MV-1-Lu, la inhibición de esta citoquina mediante los péptidos conlleva el restablecimiento del crecimiento de las células MV-1-Lu.

Como se puede observar en la Figura 4 el péptido P12, procedente de la secuencia del TGF β 1, es el que presenta una mayor actividad inhibitoria del TGF β 1. Con el fin de estudiar con más detalle el efecto inhibitorio del péptido P12 se realizó un estudio del efecto de la concentración del péptido sobre la inhibición de la citoquina, el cual se indica a continuación.

Ensayo dosis-respuesta de la inhibición del TGF β 1 por el péptido P12

Se estudió el efecto de la concentración del péptido P12 sobre la inhibición de la actividad del TGF β 1. Debido a que este péptido no fue fácilmente soluble en el medio de ensayo, se prepararon soluciones o suspensiones madre de concentración nominal de péptido (aquella que se hubiera logrado si el péptido se hubiera disuelto completamente) y a partir de ellas se tomaron alícuotas que se filtraron o bien se usaron directamente para los ensayos de inhibición.

En la Figura 5 se estudia el efecto inhibidor de concentraciones nominales de péptido, antes y después de filtrar. Se observa que el péptido P12 filtrado y sin filtrar tiene prácticamente la misma actividad.

Una vez obtenidos los resultados con el péptido P12 se decidió alargar el péptido tanto, en el sentido N-terminal como C-terminal y estudiar el efecto sobre su actividad. Además se hicieron modificaciones en su secuencia para mejorar su solubilidad y estudiar la importancia de las dos Cisteínas de su secuencia sobre la actividad inhibitoria

del TGFβ1. Los péptidos sintetizados se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Péptidos procedentes de la modificación del péptido P12.

	<u>Péptido</u>	<u>Secuencia</u>
10	P12 ₍₃₂₂₋₃₃₅₎	PheCysLeuGlyProCysProTyrIleTrySerLeuAspThr
	P28 ₍₃₂₂₋₃₄₄₎	PheCysLeuGlyProCysProTyrIleTrySerLeuAspThrGlnLysVal LeuAlaLeuTyr
	P29 ₍₃₁₃₋₃₃₅₎	HisGluProLysGlyTyrHisAlaAsnPheCysLeuGlyProCysProTyr IleTrySerLeuAspThr
15	P30	PheSerLeuGlyProCysProTyrIleTrySerLeuAspThr
	P31	PheCysLeuGlyProSerProTyrIleTrySerLeuAspThr
	P32	PheSerLeuGlyProSerProTyrIleTrySerLeuAspThr
	P33	PheCysLeuGlyProCysProTyrIleTrySerAspAspAsp
	P34	AspAspAspGlyProCysProTyrIleTrySerLeuAspThr
20	P35	AspAspAspGlyProCysProTyrIleTrySerAspAspAsp
	P36	GlyProCysProTyrIleTrySerAspAspAsp
	P37	AspAspAspGlyProCysProTyrIleTrySer
	P38	AspGlyProCysProTyrIleTrySerAsp

En la Figura 6 se muestran los resultados de la inhibición del TGFβ1 por parte de los péptidos de la Tabla 3.

En la Figura 6 se observa que el péptido P29 es activo. Este péptido engloba al péptido P12 probado anteriormente y tiene 9 aminoácidos mas hacia el extremo N-terminal (Figura 4). Estudios realizados por Quian SW y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89:6290-6294) y por Burmester JK y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:8628-8632) mediante la utilización de proteínas quiméricas recombinantes identificaron una región del TGFβ1 necesaria para la actividad de esta citoquina (aminoácidos 40 a 82, en la secuencia del TGFβ1 maduro). Se especuló que el péptido P29 (aminoácidos 34 a 56, en la secuencia del TGFβ1 maduro) al abarcar una zona mayor que el péptido P12 (aminoácidos 43 a 56), podría adquirir una estructura tridimensional más semejante a la estructura del TGFβ1 en circulación. Por este motivo se utilizó el péptido P29 para ensayos de unión a los receptores celulares, basados en el marcaje por afinidad.

Ensayos de inhibición de la unión del TGF β 1 a sus receptores por el péptido P29 (marcaje por afinidad)

5 El péptido P29 procedente de la secuencia del TGF β 1, se utilizó en los ensayos de marcaje por afinidad para comprobar su capacidad de inhibición de la unión del TGF β 1 a sus receptores celulares (Material y Métodos).

Debido a la diferente actividad de los lotes de ^{125}I -
10 TGF β 1 empleados, las concentraciones de péptido utilizadas en los ensayos se ajustaron en función de la concentración del lote ^{125}I -TGF β 1 utilizado en cada caso. Los resultados de estos ensayos se muestran en las Figuras 7 y 8.

Se realizaron ensayos posteriores para buscar la con-
15 centración mínima necesaria para bloquear la unión del ^{125}I -TGF β 1 a los receptores celulares.

Inhibición del TGF β 1 mediante péptidos procedentes de la secuencia del receptor de tipo III de rata

20

Con el propósito de encontrar nuevos péptidos inhibidores de la actividad del TGF β 1 se sintetizaron péptidos procedentes del receptor tipo III de rata. Algunos péptidos se eligieron en base a zonas de su secuencia que fueron
25 predichas como complementarias a bloques de aminoácidos de la secuencia del TGF β 1. Se esperaba que estos péptidos fueran capaces de unirse al TGF β 1 libre, secuestrándolo e impidiendo su unión a los receptores celulares.

Otros péptidos se sintetizaron solapando 10 aminoácidos y cubriendo parte de la zona extracelular del receptor de tipo III (aminoácidos 45 a 410). Se ha descrito que existe un receptor tipo III soluble que se corresponde con la zona extracelular del receptor, esta zona se corta de la membrana y actúa como un secuestrador del TGF β 1 en circu-
30

lación (López Casillas F. y col. (1991) Cell 67:785-795). Estudios posteriores han descrito dos posibles zonas de unión al TGFβ1, una de ellas se encuentra en el extremo N-terminal del receptor (López-Casillas y col. (1994) J. Cell Biol. 124:557-568) y la otra se encuentra en la zona más próxima a la membrana, hacia el extremo C-terminal (Fukushima D. y col. (1993) J. Biol. Chem. 268:22710-22715; Pepin MC y col. (1995) FEBS Lett 377:368-372). Por estos motivos se sintetizaron péptidos de la zona extracelular de este receptor suponiendo que estos péptidos podrían ser capaces de secuestrar el TGFβ1 circulante.

En la Tabla 4 se muestran los péptidos sintetizados.

Tabla 4. Péptidos procedentes del receptor tipo III de rata. Se indica el número del péptido y su secuencia. P39 a P65 son péptidos predichos como complementarios al TGFβ1 y P66 a P138 son péptidos solapados que cubren la región extracelular del receptor. Por comodidad de síntesis todos los péptidos se sintetizaron con una alanina añadida en el extremo C-terminal que no se indica en la tabla.

Péptido	Secuencia
---------	-----------

P39 ₍₉₁₋₁₀₂₎	AsnProIleAlaSerValHisThrHisHisLysPro
P40 ₍₁₀₄₋₁₁₅₎	ValPheLeuLeuAsnSerProGlnProLeuValTry
P41 ₍₁₀₉₋₁₂₀₎	SerProGlnProLeuValTryHisLeuLysThrGlu
P42 ₍₁₁₀₋₁₂₁₎	ProGlnProLeuValTryHisLeuLysThrGluArg
P43 ₍₃₃₃₋₃₄₄₎	TryAlaLeuAspAsnGlyTyrArgProValThrSer
P44 ₍₄₂₈₋₄₃₉₎	ProIleValProSerValGlnLeuLeuProAspHis
P45 ₍₅₅₅₋₅₆₆₎	GlyAspGluGlyGluThrAlaProLeuSerArgAla
P46 ₍₅₆₃₋₅₇₄₎	LeuSerArgAlaGlyValValValPheAsnCysSer
P47 ₍₆₀₃₋₆₁₄₎	LeuPheLeuValProSerProGlyValPheSerVal
P48 ₍₆₀₅₋₆₁₆₎	LeuValProSerProGlyValPheSerValAlaGlu
P49 ₍₇₀₇₋₇₁₈₎	GluLeuThrLeuCysSerArgLysLysGlySerLeu
P50 ₍₇₁₂₋₇₂₃₎	SerArgLysLysGlySerLeuLysLeuProArgCys
P51 ₍₇₁₇₋₇₂₈₎	SerLeuLysLeuProArgCysValThrProAspAsp
P52 ₍₇₂₂₋₇₃₃₎	ArgCysValThrProAspAspAlaCysThrSerLeu
P53 ₍₇₂₇₋₇₃₈₎	AspAspAlaCysThrSerLeuAspAlaThrMetIle
P54 ₍₇₃₁₋₇₄₂₎	ThrSerLeuAspAlaThrMetIleTryThrMetMet
P55 ₍₇₃₂₋₇₄₃₎	SerLeuAspAlaThrMetIleTryThrMetMetGln
P56 ₍₇₃₇₋₇₄₈₎	MetIleTryThrMetMetGlnAsnLysLysThrPhe
P57 ₍₇₄₂₋₇₅₂₎	MetGlnAsnLysLysThrPheThrLysProLeuAla
P58 ₍₇₄₇₋₇₅₈₎	ThrPheThrLysProLeuAlaValLeuGlnVal
P59 ₍₇₆₁₋₇₇₅₎	LysGluAsnValProSerThrLysAspSerSerProIleProPro
P60 ₍₇₆₆₋₇₈₀₎	SerThrLysAspSerSerProIleProProProProGlnIle

P61₍₇₇₁₋₇₈₅₎ SerProIleProProProProGlnIlePheHisGlyLeuAsp
P62₍₇₇₆₋₇₉₀₎ ProProProGlnIlePheHisGlyLeuAspThrLeuThrValMet
P63₍₇₈₁₋₇₉₅₎ PheHisGlyLeuAspThrLeuThrValMetGlyIleAlaPheAla
P64₍₇₈₆₋₈₀₀₎ ThrLeuThrValMetGlyIleAlaPheAlaAlaPheValIleGly
P65₍₇₉₇₋₈₀₉₎ LeuLeuThrGlyAlaLeuTryTyrIleTyrSerHis
P66₍₄₅₋₅₉₎ LeuMetGluSerPheThrValLeuSerGlyCysAlaSerArgGly
P67₍₅₀₋₆₄₎ ThrValLeuSerGlyCysAlaSerArgGlyThrThrGlyLeuPro
P68₍₅₅₋₆₉₎ CysAlaSerArgGlyThrThrGlyLeuProArgGluValHisVal
P69₍₆₀₋₇₄₎ ThrThrGlyLeuProArgGluValHisValLeuAsnLeuArgSer
P70₍₆₅₋₇₉₎ ArgGluValHisValLeuAsnLeuArgSerThrAspGlnGlyPro
P71₍₇₀₋₈₄₎ LeuAsnLeuArgSerThrAspGlnGlyProGlyGlnArgGlnArg
P72₍₇₅₋₈₉₎ ThrAspGlnGlyProGlyGlnArgGlnArgGluValThrLeuHis
P73₍₈₀₋₉₄₎ GlyGlnArgGlnArgGluValThrLeuHisLeuAsnProIleAla
P74₍₈₅₋₉₉₎ GluValThrLeuHisLeuAsnProIleAlaSerValHisThrHis
P75₍₉₀₋₁₀₄₎ LeuAsnProIleAlaSerValHisThrHisHisLysProIleVal
P76₍₉₅₋₁₀₉₎ SerValHisThrHisHisLysProIleValPheLeuLeuAsnSer
P77₍₁₀₀₋₁₁₄₎ HisLysProIleValPheLeuLeuAsnSerProGlnProLeuVal
P78₍₁₀₅₋₁₁₉₎ PheLeuLeuAsnSerProGlnProLeuValTryHisLeuLysThr
P79₍₁₁₀₋₁₂₄₎ ProGlnProLeuValTryHisLeuLysThrGluArgLeuAlaAla
P80₍₁₁₅₋₁₂₉₎ TryHisLeuLysThrGluArgLeuAlaAlaGlyValProArgLeu
P81₍₁₂₀₋₁₃₄₎ ArgLeuAlaAlaGlyValProArgLeuPheLeuValSerGluGly
P82₍₁₂₅₋₁₃₉₎ GlyValProArgLeuPheLeuValSerGluGlySerValValGln
P83₍₁₃₀₋₁₄₄₎ PheLeuValSerGluGlySerValValGlnPheProSerGlyAsn
P84₍₁₃₅₋₁₄₉₎ GlySerValValGlnPheProSerGlyAsnPheSerLeuThrAla
P85₍₁₄₀₋₁₅₄₎ PheProSerGlyAsnPheSerLeuThrAlaGluThrGluGluArg
P86₍₁₄₅₋₁₅₉₎ PheSerLeuThrAlaGluThrGluGluArgAsnPheProGlnGlu
P87₍₁₅₀₋₁₆₄₎ GluThrGluGluArgAsnPheProGlnGluAsnGluHisLeuVal
P88₍₁₅₅₋₁₆₉₎ AsnPheProGlnGluAsnGluHisLeuValArgTryAlaGlnLys
P89₍₁₆₀₋₁₇₄₎ AsnGluHisLeuValArgTryAlaGlnLysGluTyrGlyAlaVal
P90₍₁₆₅₋₁₇₉₎ ArgTryAlaGlnLysGluTyrGlyAlaValThrSerPheThrGlu
P91₍₁₇₀₋₁₈₄₎ GluTyrGlyAlaValThrSerPheThrGluLeuLysIleAlaArg
P92₍₁₇₅₋₁₈₉₎ ThrSerPheThrGluLeuLysIleAlaArgAsnIleTyrIleLys
P93₍₁₈₀₋₁₉₄₎ LeuLysIleAlaArgAsnIleTyrIleLysValGlyGluAspGln
P94₍₁₈₅₋₁₉₉₎ AsnIleTyrIleLysValGlyGluAspGlnValPheProProThr
P95₍₁₉₀₋₂₀₁₎ ValGlyGluAspGlnValPheProProThrCysAsnIleGlyLys
P96₍₁₉₅₋₂₀₉₎ ValPheProProThrCysAsnIleGlyLysAsnPheLeuSerLeu
P97₍₂₀₀₋₂₁₄₎ CysAsnIleGlyLysAsnPheLeuSerLeuAsnTyrLeuAlaGlu
P98₍₂₀₅₋₂₁₉₎ AsnPheLeuSerLeuAsnTyrLeuAlaGluTyrLeuGlnProLys
P99₍₂₁₀₋₂₂₄₎ AsnTyrLeuAlaGluTyrLeuGlnProLysAlaAlaGluGlyCys
P100₍₂₁₅₋₂₂₉₎ TyrLeuGlnProLysAlaAlaGluGlyCysValLeuProSerGln
P101₍₂₂₀₋₂₃₄₎ AlaAlaGluGlyCysValLeuProSerGlnProHisGluLysGlu
P102₍₂₂₅₋₂₃₉₎ ValLeuProSerGlnProHisGluLysGluValHisIleIleGlu
P103₍₂₃₀₋₂₄₄₎ ProHisGluLysGluValHisIleIleGluLeuIleThrProSer
P104₍₂₃₅₋₂₄₉₎ ValHisIleIleGluLeuIleThrProSerSerAsnProTyrSer
P105₍₂₄₀₋₂₅₄₎ LeuIleThrProSerSerAsnProTyrSerAlaPheGlnValAsp
P110₍₂₆₅₋₂₇₉₎ AspProGluValValLysAsnLeuValLeuIleLeuLysCysLys
P111₍₂₇₀₋₂₈₄₎ LysAsnLeuValLeuIleLeuLysCysLysLysSerValAsnTry
P112₍₂₇₅₋₂₈₉₎ IleLeuLysCysLysLysSerValAsnTryValIleLysSerPhe
P113₍₂₈₀₋₂₉₄₎ LysSerValAsnTryValIleLysSerPheAspValLysGlyAsn
P114₍₂₈₅₋₂₉₉₎ ValIleLysSerPheAspValLysGlyAsnLeuLysValIleAla
P115₍₂₉₀₋₃₀₄₎ AspValLysGlyAsnLeuLysValIleAlaProAsnSerIleGly
P106₍₂₄₅₋₂₅₉₎ SerAsnProTyrSerAlaPheGlnValAspIleIleValAspIle
P107₍₂₅₀₋₂₆₄₎ AlaPheGlnValAspIleIleValAspIleArgProAlaGlnGlu
P108₍₂₅₅₋₂₆₉₎ IleIleValAspIleArgProAlaGlnGluAspProGluValVal
P109₍₂₆₀₋₂₇₄₎ ArgProAlaGlnGluAspProGluValValLysAsnLeuValLeu
P116₍₂₉₅₋₃₀₉₎ LeuLysValIleAlaProAsnSerIleGlyPheGlyLysGluSer
P117₍₃₀₀₋₃₁₄₎ ProAsnSerIleGlyPheGlyLysGluSerGluArgSerMetThr
P118₍₃₀₅₋₃₁₉₎ PheGlyLysGluSerGluArgSerMetThrMetThrLysLeuVal
P119₍₃₁₀₋₃₂₄₎ GluArgSerMetThrMetThrLysLeuValArgAspAspIlePro

P120₍₃₁₅₋₃₂₉₎ MetThrLysLeuValArgAspAspIleProSerThrGlnGluAsn
P121₍₃₂₀₋₃₃₄₎ ArgAspAspIleProSerThrGlnGluAsnLeuMetLysTryAla
P122₍₃₂₅₋₃₃₉₎ SerThrGlnGluAsnLeuMetLysTryAlaLeuAspAsnGlyTyr
P123₍₃₃₀₋₃₄₄₎ LeuMetLysTryAlaLeuAspAsnGlyTyrArgProValThrSer
P124₍₃₃₅₋₃₄₉₎ LeuAspAsnGlyTyrArgProValThrSerTyrThrMetAlaPro
P125₍₃₄₀₋₃₅₄₎ ArgProValThrSerTyrThrMetAlaProValAlaAsnArgPhe
P126₍₃₄₅₋₃₅₉₎ TyrThrMetAlaProValAlaAsnArgPheHisLeuArgLeuGlu
P127₍₃₅₀₋₃₆₄₎ ValAlaAsnArgPheHisLeuArgLeuGluAsnAsnGluGluMet
P128₍₃₅₅₋₃₆₉₎ HisLeuArgLeuGluAsnAsnGluGluMetArgAspGluGluVal
P129₍₃₆₀₋₃₇₄₎ AsnAsnGluGluMetArgAspGluGluValHisThrIleProPro
P130₍₃₆₅₋₃₇₉₎ ArgAspGluGluValHisThrIleProProGluLeuArgIleLeu
P131₍₃₇₀₋₃₈₄₎ HisThrIleProProGluLeuArgIleLeuLeuAspProAspHis
P132₍₃₇₅₋₃₈₉₎ GluLeuArgIleLeuLeuAspProAspHisProProAlaLeuAsp
P133₍₃₈₀₋₃₉₄₎ LeuAspProAspHisProProAlaLeuAspAsnProLeuPhePro
P134₍₃₈₅₋₃₉₉₎ ProProAlaLeuAspAsnProLeuPheProGlyGluGlySerPro
P135₍₃₉₀₋₄₀₄₎ AsnProLeuPheProGlyGluGlySerProAsnGlyGlyLeuPro
P136₍₃₉₅₋₄₀₉₎ GlyGluGlySerProAsnGlyGlyLeuProPheProPheProAsp
P137₍₄₀₀₋₄₁₄₎ AsnGlyGlyLeuProPheProPheProAspIleProArgArgGly
P138₍₄₀₅₋₄₁₉₎ PheProPheProAspIleProArgArgGlyTryLysGluGlyGlu

Los péptidos de la Tabla 4 se ensayaron en cuanto a su capacidad de bloquear el TGFβ1 en el modelo de inhibición de la línea celular MV-1-Lu. Puesto que el TGFβ1 es capaz de inhibir el crecimiento de esta línea, la inhibición del TGFβ1 por parte de los péptidos sería capaz de restablecer el crecimiento celular. Estos ensayos se muestran en las Figuras 9 a 12.

Como se puede ver en las Figuras 9 a 12 existen varios péptidos capaces de inhibir en mayor o menor grado el crecimiento de la línea celular MV-1-Lu, aunque sólo el péptido P54 es capaz de inhibir casi por completo la actividad del TGFβ1. Con el fin de realizar un estudio más a fondo de este péptido se realizaron ensayos utilizando diferentes concentraciones de péptido frente a una concentración fija de TGFβ1 de 200 pg/ml.

Ensayo dosis-respuesta de la inhibición del TGFβ1 por el péptido P54

Se estudió el efecto de la concentración del péptido P54 sobre la inhibición de la actividad del TGFβ1. Debido a la poca solubilidad de este péptido se prepararon solucio-



THIS PAGE BLANK (USPTO)

nes madre de concentración nominal de péptido, tal y como se hizo en el caso del péptido P12, a partir de ellas se tomaron alícuotas que se filtraron o bien se usaron directamente para los ensayos de inhibición.

5 En la Figura 13 se estudia el efecto inhibidor de concentraciones nominales de péptido, antes y después de filtrar. Se observa que en el filtrado del péptido P54 no hay actividad inhibitoria medible.

10 Una vez comprobada la capacidad del péptido P54 de inhibir la actividad del TGF β 1 de una manera dependiente de la dosis utilizada se procedió a sintetizar nuevos péptidos, tomando como base la secuencia del P54, con el fin de intentar mejorar la solubilidad y con ello su actividad a dosis más bajas. También se sintetizaron dos péptidos procedentes del receptor de tipo III humano. Uno de estos péptidos (P144) es equivalente al péptido P54. El otro péptido (P145) es similar al péptido P106 del receptor de tipo III de rata que también había mostrado actividad. Estos nuevos péptidos se indican en la Tabla 5.

20

Tabla 5. Péptidos procedentes de la modificación del péptido P54 (péptidos P139 a P143) y del receptor de tipo III humano (péptidos P144 y P145).

25	<u>Péptido</u>	<u>Secuencia</u>	<u>Procedencia</u>
	P54 ₍₇₃₁₋₇₄₂₎	ThrSerLeuAspAlaThrMetIleTryThrMetMet	Receptor Tipo III Rata
	P139	ThrSerLeuAspAlaThrMetIleTryAspAspAsp	
	P140	AspAspAspAlaThrMetIleTryThrMetMet	
30	P141	AspAlaThrMetIleTryAsp	
	P142	ThrSerLeuMetIleTryThrMetMet	
	P143	ThrSerLeuAspAlaThrThrMetMet	
	P144 ₍₇₂₉₋₇₄₂₎	ThrSerLeuAspAlaSerIleIleTryAlaMetMet	Receptor Tipo III Humano
		GlnAsn	
35	P145 ₂₄₁₋₂₅₄₎	SerAsnProTyrSerAlaPheGlnValAspIleThr	Receptor Tipo III Humano
		IleAsp	

El ensayo de actividad de los péptidos de la Tabla 5 se indica en la Figura 14.

Ensayo dosis-respuesta de la inhibición del TGFβ1 por el péptido P144

Se realizó un ensayo dosis respuesta con el péptido P144 procedente de la secuencia del receptor tipo III humano, con el fin de comprobar si su actividad era dependiente de la concentración (Figura 15). Se puede ver como la actividad del péptido decae conforme se disminuye la concentración de péptido utilizada en los ensayos.

Ensayos de inhibición de la unión del TGFβ1 a sus receptores por el péptido P144 (marcaje por afinidad)

El péptido P144 procedente de la secuencia del receptor de tipo III humano, se utilizó en los ensayos de marcaje por afinidad para comprobar su capacidad de inhibición de la unión del TGFβ1 a sus receptores celulares (Material y Métodos).

Debido a la diferente actividad de los lotes de ¹²⁵I-TGFβ1 empleados, las concentraciones de péptido utilizadas en los ensayos se ajustaron en función de la concentración del lote ¹²⁵I-TGFβ1 utilizado en cada caso. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 15.

Una vez comprobada la inhibición de la unión del TGFβ1 a sus receptores celulares mediante el péptido P144, se realizó un nuevo ensayo con el fin de titular el péptido P144. Se observó que el péptido perdía su actividad a la concentración de 2×10^5 veces la concentración molar de ¹²⁵I-TGFβ1.

Inhibición del TGFβ1 mediante péptidos procedentes de otras proteínas con capacidad de unirse al TGFβ1 y predichos como complementarios al TGFβ1

En esta serie se sintetizaron los péptidos de la Tabla 6 procedentes de proteínas capaces de unirse al TGFβ1.

Tabla 6. Péptidos procedentes de distintas proteínas capaces de unirse al TGF β 1 (receptor tipo II P146, fetuina P147 a P149, endoglina P150 a P154 y α 2-Macroglobulina P155 a P179). Se indica el número del péptido junto a su posición en la secuencia completa, su secuencia de aminoácidos, así como su procedencia. Por comodidad de síntesis todos los péptidos se sintetizaron con una alanina añadida en el extremo C-terminal que no se indica en la tabla.

10

	Péptidos	Secuencia	Procedencia	
	P146 ₍₈₄₋₁₀₁₎	CysValAlaValTryArgLysAsnAspGluAsnIleThr LeuGluThrValCys	Receptor Tipo II II
15	P147 ₍₁₁₄₋₁₃₂₎	CysAspPheGlnLeuLeuLysLeuAspGlyLysPheSer ValValTyrAlaLysCys	Fetuina
	P148 ₍₁₁₄₋₁₃₂₎	CysAspPheHisIleLeuLysGlnAspGlyGlnPheArg ValCysHisAlaGlnCys	Fetuina
20	P149 ₍₁₁₄₋₁₃₂₎	CysAspIleHisValLeuLysGlnAspGlyPheSerVal LeuPheThrLysCysAsp	Fetuina
	P150 ₍₂₄₇₋₂₆₁₎	GluAlaValLeuIleLeuGlnGlyProProTyrValSer TryLeu	Endoglina
	P151 ₍₂₈₉₋₃₀₃₎	ValAsnLeuProAspThrArgGlnGlyLeuLeuGluGlu AlaArg	Endoglibna
25	P152 ₍₄₄₅₋₄₅₉₎	LeuAspSerLeuSerPheGlnLeuGlyLeuTyrLeuSer ProHis	Endoglina
	P153 ₍₄₈₁₋₄₉₅₎	ProSerIleProGluLeuMetThrGlnLeuAspSerCys GlnLeu	Endoglina
30	P154 ₍₄₇₉₋₄₉₃₎	MetSerProSerIleProGluLeuMetThrGlnLeuAsp SerCys	Endoglina
	P155 ₍₁₁₃₋₂₄₎	LeuLeuLeuLeuValLeuLeuProThrAspAlaSer	α 2-Macroglobulina
	P156 ₍₂₀₋₃₁₎	ProThrAspAlaSerValSerGlyLysProGlnTyr	α 2-Macroglobulina
	P157 ₍₄₄₋₅₅₎	ThrGluLysGlyCysValLeuLeuSerTyrLeuAsn	α 2-Macroglobulina
	P158 ₍₁₆₆₋₁₇₇₎	TyrIleGlnAspProLysGlyAsnArgIleAlaGln	α 2-Macroglobulina
35	P158 ₍₁₆₆₋₁₇₇₎	TyrIleGlnAspProLysGlyAsnArgIleAlaGln	α 2-Macroglobulina
	P159 ₍₁₉₂₋₂₀₃₎	PheProLeuSerSerGluProPheGlnGlySerTyr	α 2-Macroglobulina
	P160 ₍₂₄₇₋₂₅₈₎	AsnValSerValCysGlyLeuTyrThrTyrGlyLys	α 2-Macroglobulina
	P161 ₍₂₄₈₋₂₅₉₎	ValSerValCysGlyLeuTyrThrTyrGlyLysPro	α 2-Macroglobulina
	P162 ₍₂₅₀₋₂₆₁₎	ValCysGlyLeuTyrThrTyrGlyLysProValPro	α 2-Macroglobulina
40	P163 ₍₂₆₇₋₂₇₈₎	SerIleCysArgLysTyrSerAspAlaSerAspCys	α 2-Macroglobulina
	P164 ₍₄₆₉₋₄₈₀₎	ProCysGlyHisThrGlnThrValGlnAlaHisTyr	α 2-Macroglobulina
	P165 ₍₅₅₄₋₅₆₅₎	AspSerAlaLysTyrAspValGluAsnCysLeuAla	α 2-Macroglobulina
	P167 ₍₇₉₀₋₈₀₁₎	GlnProPhePheValGluLeuThrMetProTyrSer	α 2-Macroglobulina
	P168 ₍₈₂₇₋₈₃₈₎	GlnLeuGluAlaSerProAlaPheLeuAlaValPro	α 2-Macroglobulina
	P169 ₍₈₃₅₋₈₃₆₎	SerValGlnLeuGluAlaSerProAlaPheLeuAla	α 2-Macroglobulina
	P170 ₍₈₇₆₋₈₈₇₎	AlaLeuGluSerGlnGluLeuCysGlyThrGluVal	α 2-Macroglobulina
	P171 ₍₁₀₀₁₋₁₀₁₂₎	LysSerLysIleGlyTyrLeuAsnThrGlyTyr	α 2-Macroglobulina

	P172 ₍₁₀₀₅₋₁₀₁₆₎	IleGlyTyrLeuAsnThrGlyTyrGlnArgGlnLeu	α2-Macroglobulina
	P173 ₍₁₀₆₂₋₁₀₇₃₎	LysArgLysGluValLeuLysSerLeuAsnGluGlu	α2-Macroglobulina
	P174 ₍₁₁₉₃₋₁₂₀₄₎	ValGlyHisPheTyrGluProGlnAlaProSerAla	α2-Macroglobulina
	P175 ₍₁₂₀₉₋₁₂₂₀₎	ThrSerTyrValLeuLeuAlaTyrLeuThrGlnAla	α2-Macroglobulina
5	P176 ₍₁₂₁₁₋₁₂₂₂₎	TyrValLeuLeuAlaTyrLeuThrAlaGlnProAla	α2-Macroglobulina
	P177 ₍₁₂₅₆₋₁₂₆₇₎	ValAlaLeuHisAlaLeuSerLysTyrGlyAlaAla	α2-Macroglobulina
	P178 ₍₁₂₃₂₋₁₂₄₃₎	TyrGlyArgAsnGlnGlyAsnThrTryLeuThrAla	α2-Macroglobulina
	P179 ₍₁₂₃₄₋₁₂₄₅₎	ArgAsnGlnGlyAsnThrTryLeuThrAlaPheVal	α2-Macroglobulina

10 En las Figuras 17 y 18 se indica la actividad inhibitoria de los péptidos procedentes de la Tabla 10.

Como puede observarse en las Figuras 17 y 18 sólo el péptido P150 mostró actividad superior al 50%. Sin embargo, los péptidos P146 y P149 que habían sido descritos como
15 activos por Demetriou M y col (1996) J Biol Chem 271:12755-12761 no resultaron activos en las condiciones utilizadas para este ensayo.

Medición por citometría de flujo del efecto inhibitorio de
20 péptidos sintéticos sobre la unión del TGFβ1 a sus receptores celulares

Péptidos procedentes de síntesis anteriores, tanto los que se sintetizaron a partir de la secuencia del TGFβ1 como
25 del receptor tipo III, se utilizaron para medir, por citometría de flujo, su capacidad inhibitoria de la unión del TGFβ1 a los receptores celulares. En estos ensayos las células se incuban con el péptido antes de añadir el TGFβ1-biotina que se revelará utilizando avidina-FITC (Material y
30 Métodos). Posteriormente se mide la fluorescencia emitida por la avidina-FITC, que será directamente proporcional a la cantidad de TGFβ1 unido a las células e inversamente proporcional a la actividad del péptido. En la Figura 19 y en la Tabla 7 se indican los resultados obtenidos con los
35 péptidos más relevantes.

Tabla 7. Comparación de la actividad inhibitoria del TGFβ1, de algunos péptidos, medida mediante el bioensayo de inhi-

bición del crecimiento de las células MV-1-Lu¹ (concentración de péptido 200 µg/ml) con la inhibición de la unión del TGFβ1 a sus receptores celulares medida mediante citometría de flujo² (concentración de péptido 420 µg/ml).

	Péptidos	bioensayo (%inhibición) ¹	Cysitometría (%inhibición) ²	Secuencia
5				
10	P29	77,6	92,34	HisGluProLysGlyTyrHis AlaAsnPheCysLeuGlyPro CysProTyrIleTrySerLeu AspThr
	P11	40	86	HisAlaAsnPheCysLeuGly ProCysProTyrIleTrySer Leu
15	P12	96	77	PheCysLeuGlyProCysPro TyrIleTrySerLeuAspThr
	P18	18,2	6,5	LeuTyrAsnGlnHisAsnPro GlyAlaSerAlaAlaProCys Cys
20	P54	97	82,3	ThrSerLeuAspAlaThrMet IleTryThrMetMet
	P140	-1,7	69,8	AspAspAspAlaThrMetIle TryThrMetMet
25	P142	70	72	ThrSerLeuMetIleTryThr MetMet
	P106	40	91	SerAsnProTyrSerAlaPhe GlnValAspIleIleValAsp Ile
30	P145	21	74,35	SerAsnProTyrSerAlaPhe GlnValAspIleThrIleAsp
	P144	88	80	ThrSerLeuAspAlaSerIle IleTryAlaMetMetGlnAsn
35	P150	64	73	GluAlaValLeuIleLeuGln GlyProProTyrValSerTry Leu
	P152	45	68,4	LeuAspSerLeuSerPheGln LeuGlyLeuTyrLeuSerPro His
40				

INHIBICIÓN IN VIVO DE LA ACTIVIDAD DEL TGFβ1

El péptido P144 procedente de la secuencia del receptor tipo III humano, que había resultado activo en los bio-
 45 ensayos de inhibición del crecimiento de la línea celular MV-1-Lu, se utilizó en los ensayos *in vivo* para estudiar su efecto inhibitorio en la inducción de cirrosis experimental con CCl₄, en un modelo de ratas.

50 *Modelo de cirrosis experimental en ratas Wistar*

THIS PAGE BLANK (USPTO)

En este modelo la cirrosis hepática se induce mediante inhalación de tetracloruro de carbono, durante 11 semanas, dos veces por semana (López Novoa JM y col. (1976) Patología IX:223-240; Camps J. y col. (1987) Gastroenterology 93:498-505) tal y como se indica en Material y Métodos.

El péptido P144 se administró de acuerdo a dos protocolos:

1. *Protocolo 1*: El péptido se administró en días alternos por vía intraperitoneal durante el proceso de inducción de la cirrosis (11 semanas). Figuras 20 y 21.
2. *Protocolo 2*: El péptido se administró en días alternos por vía intraperitoneal durante 3 semanas, una vez establecida la cirrosis, es decir a las 12 semanas del inicio de la inducción de la cirrosis. Figuras 22 y 23.

La producción de colágeno en ambos protocolos se midió mediante dos técnicas:

En la Figuras 36 y 38 se indica la producción de colágeno total medida por tinción de cortes de hígado (dos por animal) teñidos con *Fast Green* y *Direct Red*, elución del color y lectura en espectrofotómetro (Material y Métodos) (López de León A. y Rojkind, (1985) Histochem. Cytochem. 33:737-743; Gaudio E. y col. (1993) Int. J. Exp. Path. 74:463-469).

En las Figuras 21 y 23 se refleja la producción de colágeno medida por análisis de imagen a partir de cortes de hígado teñidos con rojo sirio, utilizando microscopía de luz (Material y Métodos).

Como se puede ver en la Figura 20 se observan diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el grupo de ratas tratadas con el péptido P144 (Tt_1) y el grupo de ratas cirróticas control (Ci_1) al estudiar el cociente colágeno vs proteína total. En la Figura 37 las diferencias entre el grupo de ratas tratadas con el péptido P144 (Tt_1) y el grupo de ratas cirróticas control (Ci_1) también son significativas ($P < 0,001$) al estudiar el área de fibrosis.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Como se puede observar en las figuras 22 y 23, en las que se muestran los resultados de las ratas tratadas una vez establecida la cirrosis, las diferencias entre los grupos de ratas tratadas con el péptido P144 (Tto_2) y las 5 cirróticas sin tratar (Ci_2) no son significativas cuando se utilizan cualquiera de las dos técnicas de medición de fibrosis.

Las dos técnicas utilizadas para la medición de colágeno se compararon entre sí mediante una regresión lineal 10 con el fin de comprobar la aleatoriedad en la elección de los campos a estudio en cada preparación y con ello la validez del análisis de imagen, Figuras 24 y 25.

Como se puede observar en las gráficas 24 y 25 existe una correlación entre ambas técnicas con una $R > 0,85$ en am- 15 bos casos, siendo altamente significativa ($F \leq 0,001$). Esto confirma que la adquisición de las imágenes a estudio se realizó de forma totalmente aleatoria y con ello la validez de los datos obtenidos mediante el análisis de imagen.

En la figuras 26 y 27 se muestran las imágenes obteni- 20 das por microscopía de luz a partir de preparaciones de hígado teñidas con rojo sirio a un aumento de 10X obtenidas a partir de hígados de las ratas tratadas durante el proceso de inducción de la cirrosis (Ci_1 y Tto_1).

Las imágenes de la Figura 26 fueron obtenidas sin 25 aplicar ningún tipo de filtro.

La Figura 27 muestra las imágenes una vez modificadas para su estudio mediante un software específico. Estas modificaciones consisten en la aplicación de dos filtros, uno de luz polarizada y el otro de luz verde, con el fin de au- 30 mentar la calidad de las imágenes y facilitar su estudio de forma automatizada.

En las figuras 26 y 27 se observa que existen diferencias entre las imágenes procedentes de las ratas cirróticas (Ci_1) y las procedentes de las ratas tratadas con el 35 péptido P144 (Tto_1).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Las diferencias de efectividad entre los protocolos 1 y 2 podrían ser debidas a que la producción de TGF β 1 podría ser mucho menor una vez inducida la cirrosis (protocolo 2) que durante el proceso de inducción de cirrosis con CCl₄ (protocolo 1), e incluso podría estar en niveles normales, por lo que el efecto del tratamiento con el péptido P144 sería menos notorio en el protocolo 2 que en el protocolo 1.

Cuando se comparan los grupos de ratas cirróticas no tratadas, al final del proceso de inducción de la cirrosis (Ci₁) con las cirróticas no tratadas, a las 4 semanas de finalizada la inducción (Ci₂) se observa que existen diferencias significativas (P=0,016) entre ambos grupos (Figura 28), lo que indicaría que existe una regresión parcial de la cirrosis al eliminar el agente cirrotizante, observación que ha sido publicada por diversos autores (Szende-B y col (1992) In Vivo 6:355-361; Columbano A (1996) Carcinogenesis 17:395-400).

Estas diferencias de efectividad entre los dos protocolos también podrían ser debidas al propio protocolo ya que los animales del protocolo 2 se trataron sólo durante 3 semanas en días alternos, mientras que los animales del protocolo 1 se trataron por un periodo más amplio de tiempo (7 semanas, también en días alternos).

Los resultados obtenidos demuestran que es posible inhibir al TGF β 1 tanto *in vitro* como *in vivo* mediante péptidos sintéticos procedentes de diferentes proteínas. En un futuro sería de gran interés intentar aumentar la actividad biológica de estos péptidos. Ello podría llevarse a cabo reemplazando sistemáticamente cada uno de los aminoácidos de sus secuencias por los 19 restantes. Una vez alcanzado el péptido de mayor actividad convendría preparar mimotopos (McConnell-SJ (1994) Gene 151:115-118; Steward-MW (1995) J. Virol. 69:7668-7673) del mismo con el fin de aumentar la vida media en el organismo del agente inhibidor.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Inhibición de la unión del TGF β 1 a las células MV-1-Lu por el péptido P144, medida por citometría de flujo. A, imagen obtenida al analizar las células incubadas con TGF β 1 biotinilado y reveladas con avidina-FITC. B, imagen obtenida al analizar las células incubadas con avidina-FITC sin previa adición de TGF β 1. C, imagen obtenida al analizar las células incubadas con TGF β 1 previamente incubado con el péptido P144 a una concentración de 0,42 μ g/ μ l, el revelado se realizó con avidina-FITC. En abcisas se indica la fluorescencia emitida y en ordenadas el número de células para cada valor de fluorescencia. También se indican los campos correspondientes a las células marcadas con el TGF β 1-biotina y avidina-FITC (M2) y a las células no marcadas (M1).

Figura 2. Esquema representativo del proceso de cirrosis por CCl₄. Con flechas negras se indica cuando se administró a las ratas dos dosis semanales de CCl₄ y con flechas negras discontinuas cuando fue una dosis semanal. Las flechas grises indican la administración del péptido P144. A: Controles sanos; B: Controles sanos + P144, B₁ : con péptido 70 μ g/día; C: Cirróticos; C₁ con salino; C₂ con péptido 70 μ g/día; D: Cirróticos con CCl₄ + Fenobarbital; D₁ y salino; D₂ y péptido 70 μ g/día.

Figura 3. Efecto del TGF β 1 sobre el crecimiento de células MV-1-Lu. Las células se cultivaron a una densidad de 5000 células/pocillo a las concentraciones de TGF β 1, en pg/ml indicadas. Abcisas: Concentración TGF β 1 (pg/ml); Ordenadas: c.p.m.

Figura 4. Porcentaje de inhibición del TGF β 1 (200 pg/ml) por péptidos del TGF β 1. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200 μ g/ml. Una inhibición del TGF β 1 del 100% se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF β 1. Abcisas: péptidos P1-P27. Ordenadas: % inhibición actividad TGF β 1.

Figura 5. Porcentaje de inhibición de la actividad del TGF β 1 (200 pg/ml) en presencia de distintas concentraciones (μ M) nominales del péptido P12 filtrado (\square) y sin filtrar (\square).

Figura 6. Porcentaje de inhibición del TGF β 1 (200 pg/ml) por péptidos del TGF β 1. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200 μ g/ml. Una inhibición del TGF β 1 del 100% se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF β 1.

Figura 7. Autorradiografía de un ensayo de marcaje por afinidad de los receptores del TGF β 1. Calle C1: efecto de la incubación de las células con una concentración 0,16 μ M de 125 TGF β 1 que se corresponde con una actividad de 0,3 μ Ci (control positivo). Calle C2: efecto de la preincubación de las células con una concentración de TGF β 1 no radioactivo 10 veces superior a la de 125 I-TGF β 1 (control negativo). Calle C3: la preincubación se realizó con el péptido P29 a una concentración 10^6 veces superior a la concentración molar de 125 I-TGF β 1. Se puede observar la inhibición de la unión del 125 I-TGF β 1 a los receptores celulares tipo I, II y III tanto por parte del péptido P29 como por el TGF β 1 no radioactivo.

Figura 8. Autorradiografía de un ensayo de marcaje por afinidad de los receptores (I, II y III) del TGF β 1. Calles C1 a C6: efecto de la preincubación de las células MV-1-Lu, con distintas concentraciones del péptido P29 (10^6 , 8×10^5 , 6×10^5 , 4×10^5 , 2×10^5 , 10^5 veces la concentración molar de ^{125}I -TGF β 1 respectivamente), previas a la adición del ^{125}I -TGF β 1. Calle C7: efecto de la preincubación de las células MV-1-Lu con TGF β 1 no marcado (10^2 veces la concentración molar de ^{125}I -TGF β 1) previa a la adición del ^{125}I -TGF β 1 (control negativo). Calle C8: efecto de la incubación de las células MV-1-Lu con una concentración $0,42 \mu\text{M}$ de ^{125}I -TGF β 1 que se corresponde con una actividad de $0,4 \mu\text{Ci}$, sin preincubaciones previas (control positivo).

Figura 9. Porcentaje de inhibición del TGF β 1 (200 pg/ml) por péptidos del receptor predichos como complementarios a zonas del TGF β 1. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de $200 \mu\text{g/ml}$. Una inhibición del TGF β 1 del 100% se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF β 1. Abcisas: péptidos P39-P65. Ordenadas: % inhibición actividad TGF β 1.

Figura 10. Porcentaje de inhibición del TGF β 1 (200 pg/ml) por péptidos solapados procedentes de la región extracelular del receptor tipo III. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de $200 \mu\text{g/ml}$. Una inhibición del TGF β 1 del 100% se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF β 1. Abcisas: péptidos P66-P91. Ordenadas: % inhibición actividad TGF β 1.

Figura 11. Porcentaje de inhibición del TGF β 1 (200 pg/ml) por péptidos solapados procedentes de la región extracelular del receptor tipo III. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200 μ g/ml. Una inhibición del TGF β 1 del 100% se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF β 1. Abcisas: péptidos P92-P115. Ordenadas: % inhibición actividad TGF β 1.

Figura 12. Porcentaje de inhibición del TGF β 1 (200 pg/ml) por péptidos solapados procedentes de la región extracelular del receptor tipo III. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200 μ g/ml. Una inhibición del TGF β 1 del 100% se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF β 1. Abcisas: péptidos P116-P138. Ordenadas: % inhibición actividad TGF β 1.

Figura 13. Porcentaje de inhibición de la actividad del TGF β 1 (200 pg/ml) en presencia de distintas concentraciones (μ M) nominales del péptido P54 filtrado (\square) y sin filtrar (\bullet).

Figura 14. Porcentaje de inhibición del TGF β 1 (200 pg/ml) por péptidos del receptor procedentes de la modificación del péptido P54 (P139 a P143) y de los péptidos procedentes del receptor de tipo III humano (P144 y P145). Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200 μ g/ml. Una inhibición del TGF β 1 del 100% se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF β 1.

Figura 15. Porcentaje de inhibición de la actividad del TGF β 1 (200 pg/ml) en presencia de distintas concentraciones (μ M) nominales del péptido P144 sin filtrar.

5 Figura 16. Autorradiografía de un ensayo de marcaje por afinidad de los receptores (I, II y III) del TGF β 1. Calle C1: la preincubación se realizó con el péptido P144 a una concentración 10^6 veces superior a la concentración molar de 125 I-TGF β 1 Calles C2 y C3: efecto de la preincubación de las
10 células con una concentración de TGF β 1 no radioactivo 10 veces superior a la de 125 I-TGF β 1 (control negativo). Calle C4 y C5: efecto de la incubación de las células con una
concentración 0,1 μ M de 125 TGF β 1 que se corresponde con una actividad de 0,2 μ Ci (control positivo) Se puede observar la
15 inhibición de la unión del 125 I-TGF β 1 a los receptores celulares tanto por parte del péptido P144 como por el TGF β 1 no radioactivo.

Figura 17. Porcentaje de inhibición del TGF β 1 (200 pg/ml) por péptidos procedentes del receptor tipo II humano (P146), de la fetuina (P147 a P149) y de la endoglina (P150 a P154). Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200 μ g/ml. Una inhibición del TGF β 1 del 100% se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que
25 se obtiene en ausencia de TGF β 1.

Figura 18. Porcentaje de inhibición del TGF β 1 (200 pg/ml) por péptidos procedentes de la α 2-Macroglobulina. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200 μ g/ml.
30 Una inhibición del TGF β 1 del 100% se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausen-

cia de $\text{TGF}\beta 1$. Abcisas: péptidos P155-P179. Ordenadas: % inhibición actividad $\text{TGF}\beta 1$.

Figura 19. Porcentaje de inhibición de la unión del $\text{TGF}\beta 1$ a células MV-1-Lu por diferentes péptidos sintéticos. La inhibición se estudió midiendo el porcentaje de células marcadas (emiten fluorescencia) y sin marcar (no emiten fluorescencia) para cada péptido.

Figura 20. Efecto de la administración del péptido P144 sobre la síntesis de colágeno durante la inducción de cirrosis experimental con CCl_4 . En ordenadas se indica el cociente colágeno vs proteína total. En abcisas se indican los distintos grupos de ratas: Co= ratas sanas; Co+P144= ratas sanas tratadas con el péptido P144; Tto₁= ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl_4 y a las que se les suministra el péptido P144 en días alternos durante este periodo y Ci₁= ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl_4 durante 11 semanas y que no son tratados con el péptido P144.

Figura 21. Efecto de la administración del péptido P144 sobre la síntesis de colágeno durante la inducción de cirrosis experimental con CCl_4 . En ordenadas se indica el cociente entre el área de fibrosis y el área total en preparaciones de tejido teñidas con rojo sirio. En abcisas se indican los distintos grupos de ratas: Co= ratas sanas; Co+P144= ratas sanas tratadas con el péptido; Tto₁= ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl_4 y a las que se les suministra el péptido P144 en días alternos durante este periodo y Ci₁= ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl_4 durante 11 semanas y que no son tratados con el péptido P144.

Figura 22. Efecto de la administración del péptido P144 sobre la síntesis de colágeno una vez inducida la cirrosis

con CCl_4 . En ordenadas se indica el cociente colágeno vs proteína total. En abcisas se indican los distintos grupos de ratas: Co= ratas sanas; Co+P144= ratas sanas tratadas con el péptido; Tto₂= ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl_4 y a las que se les suministra el péptido P144 en días alternos al final de este periodo y Ci₂= ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl_4 durante 11 semanas y que no son tratados con el péptido P144.

- 10 Figura 23. Efecto de la administración del péptido P144 sobre la síntesis de colágeno una vez inducida la cirrosis con CCl_4 . En ordenadas se indica el cociente entre el área de fibrosis y el área total en preparaciones de tejido. En abcisas se indican los distintos grupos de ratas: Co= ratas sanas; Co+P144= ratas sanas tratadas con el péptido; Tto₂= ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl_4 y a las que se les suministra el péptido P144 en días alternos al final de este periodo y Ci₂= ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl_4 durante 11 semanas y que no son tratados con el péptido P144.

- Figura 24. Comparación entre los datos sobre cantidad de colágeno y área de fibrosis, obtenidos mediante las dos técnicas utilizadas. En el eje de abcisas se indican los valores del cociente entre el área de fibrosis y el área total, obtenidos mediante el análisis de imagen. En ordenadas se indican los valores del cociente entre los μg de colágeno y los mg de proteína total, obtenidos mediante el análisis por espectrofotometría de cortes de hígado teñidos con "Direct Red y Fast Green". Se indica la R^2 . ($F \leq 0,001$).

- Figura 25. Comparación entre los datos sobre cantidad de colágeno y área de fibrosis, obtenidos mediante las dos técnicas utilizadas para el estudio de las muestras al final del protocolo 2. En el eje de abcisas se indican los

THIS PAGE BLANK (USPTO)

valores del cociente entre el área de fibrosis y el área total, obtenidos mediante el análisis de imagen. En ordenadas se indican los valores del cociente entre los μg de colágeno y los mg de proteína total, obtenidos mediante el análisis por espectrofotometría de cortes de hígado teñidos con "Direct Red y Fast Green". Se indica la R^2 . ($F \leq 0,001$).

Figura 26. Imágenes representativas de los 24 campos obtenidos por microscopía de luz (10X) a partir de preparaciones de hígados de ratas teñidas con rojo sirio. Ratas cirróticas (Ci_1) al final de la inducción de cirrosis con CCl_4 y cirróticas tratadas (Tto_1) con el péptido P144 durante el proceso de inducción de la cirrosis con CCl_4 . Se tomaron diferentes campos a partir de las preparaciones procedentes de cada animal ($R = \text{rata}$ y $C = \text{campo}$).

Figura 27. Imágenes representativas de los 24 campos obtenidos por microscopía de luz (10X) a partir de preparaciones de hígados de ratas teñidas con rojo sirio. Ratas cirróticas (Ci_1) al final de la inducción de cirrosis con CCl_4 y cirróticas tratadas (Tto_1) con el péptido P144 durante el proceso de inducción de la cirrosis con CCl_4 . Se tomaron diferentes campos a partir de las preparaciones procedentes de cada animal ($R = \text{rata}$ y $C = \text{campo}$). Se ha utilizado luz polarizada y filtro verde con el fin de resaltar las fibras de colágeno.

Figura 28. Comparación entre los dos grupos de ratas cirróticas no tratadas. Ci_1 son ratas cirróticas al final de las 12 semanas de inducción de la cirrosis con CCl_4 , Ci_2 son ratas cirróticas a las 4 semanas del final del proceso de inducción de la cirrosis. $P = 0,016$. Ordenadas: Área fibrosis/Área total.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Instituto Científico y Tecnológico de Navarra (ICTN)

<120> Péptidos inibidores de TGFβ1

<160> 10

<210> SEQ ID NO: 1

<211> 15

<212> Péptido

```
<400>  His Ala Asn Phe  Cys  Ley Gly  Pro  Cys  Pro Tyr  Ile Try
                   5              10
```

Ser Leu
15

<210> SEQ ID NO: 2

<211> 14

<212> Péptido

```
<400>  Phe  Cys  Leu  Gly  Pro  Cys  Pro  Tyr  Ile  Try  Ser  Leu  Asp
              5              10
```

Thr

<210> SEQ ID NO: 3

<211> 12

<212> Péptido

```
<400> Thr Ser Leu Asp Ala Thr Met Ile Try Thr Met Met
              5              10
```

<210> SEQ ID NO: 4

<211> 15

<212> Péptido

```
<400> Ser Asn Pro Tyr Ser Ala Phe Gln Val Asp Ile Ile Val
          5                      10
```

Asp Ile
15

<210> SEQ ID NO: 5

<211> 9

<212> Péptido

<400> Thr Ser Leu Met Ile Try Thr Met Met
5

<210> SEQ ID NO: 6

<211> 14

<212> Péptido

<400> Thr Ser Leu Asp Ala Ser Ile Ile Try Ala Met Met Gln
5 10
Asn

<210> SEQ ID NO: 7

<211> 14

<212> Péptido

<400> Ser Asn Pro Tyr Ser Ala Phe Gln Val Asp Ile Thr Ile
5 10
Asp

<210> SEQ ID NO: 8

<211> 15

<212> Péptido

<400> Glu Ala Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro Tyr Val Ser
5 10
Try Leu
15

<210> SEQ ID NO: 9

<211> 15

<212> Péptido

<400> Leu Asp Ser Leu Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser
5 10
Pro His
15

<210> SEQ ID NO: 10

<211> 23

<212> Péptido

<400> His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly
 5 10
 Pro Cys Pro Tyr Ile Try Ser Leu Asp Thr
 15 20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REIVINDICACIONES

1.- Péptidos antagonistas de la unión de TGFβ1 a sus receptores en el organismo, caracterizados por presentar secuencias de aminoácidos parciales idénticas o similares a las del propio TGFβ1 y/o sus receptores.

2.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1.

3.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2.

4.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3.

5.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4.

6.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5.

7.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6.

8.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7.

9.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8.

10.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9.

11.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10.

5 12.- Mimotopos de cualquiera de los péptidos activos de las reivindicaciones 1 a 11 caracterizados por presentar un efecto antagonista similar a los mismos y una mayor vida media en el organismo que éstos.

10 13.- Procedimiento de utilización de al menos uno de los péptidos activos de las reivindicaciones 1 a 11 y/o al menos uno de sus mimotopos para fabricar una composición de aplicación en enfermedades hepáticas.

15 14.- Procedimiento de utilización de al menos un ADN que codifique para al menos uno de los péptidos activos de las reivindicaciones 1 a 11 para fabricar una composición de aplicación en enfermedades hepáticas que incluya opcionalmente al menos uno de los mimotopos de dichos péptidos activos.

20 15.- Procedimiento de utilización de al menos un sistema de expresión recombinante que codifique para al menos uno de los péptidos activos de las reivindicaciones 1 a 11 para fabricar una composición de aplicación en enfermedades hepáticas que incluya opcionalmente al menos uno de los mimotopos de dichos péptidos activos.

25 16.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque el sistema recombinante es un adenovirus defectivo.

17.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque el sistema recombinante es un plásmido.

30 18.- Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 13 a 17 de aplicación a la fibrosis hepática.

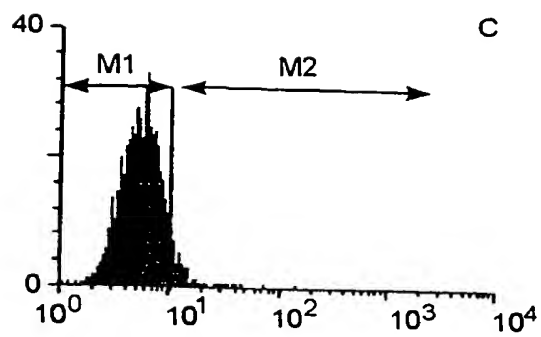
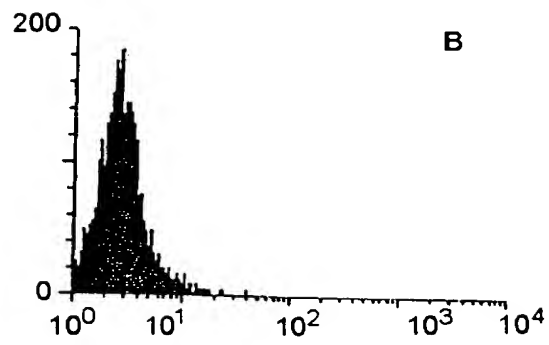
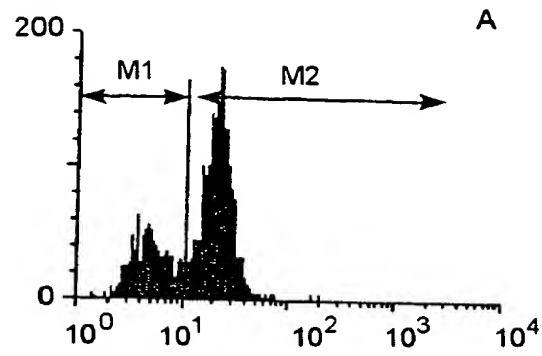


FIGURA 1

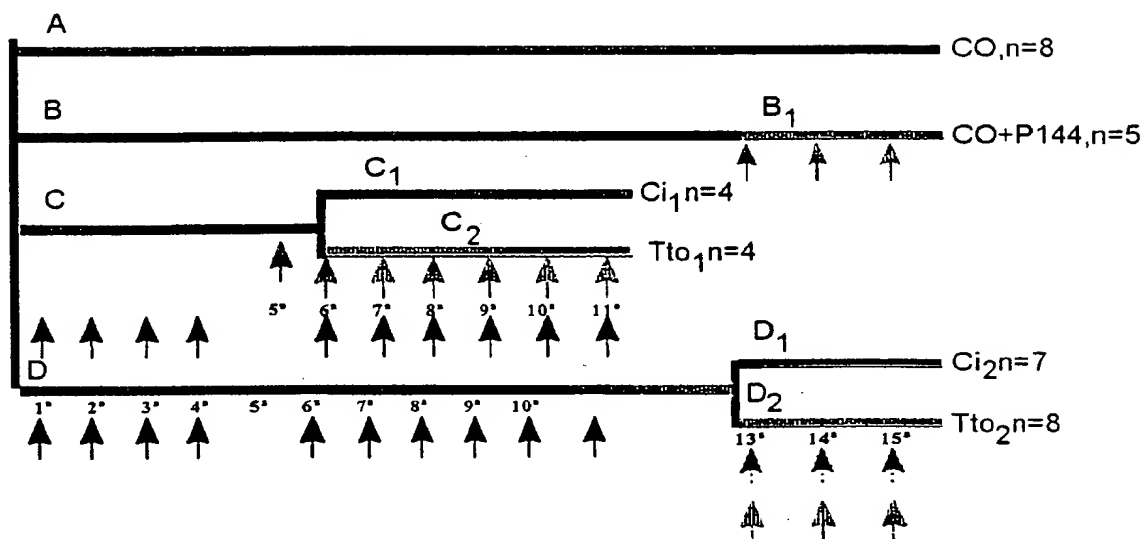


FIGURA 2

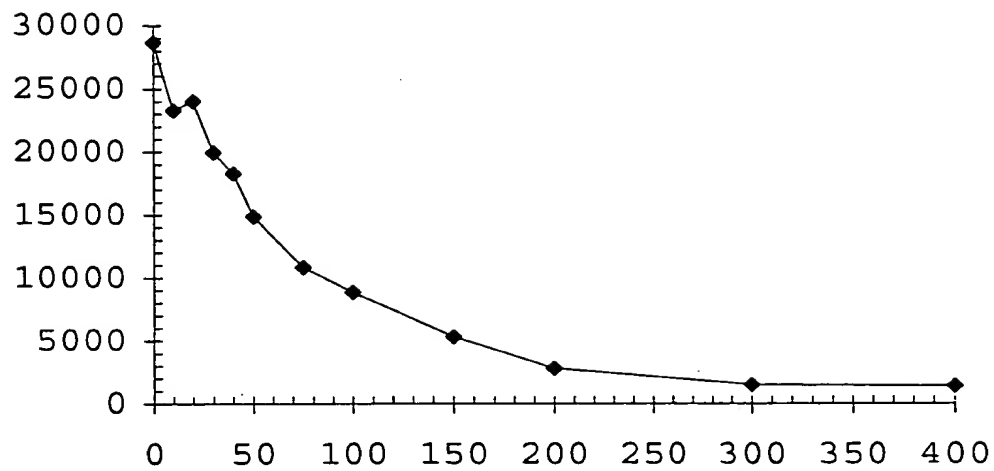


FIGURA 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

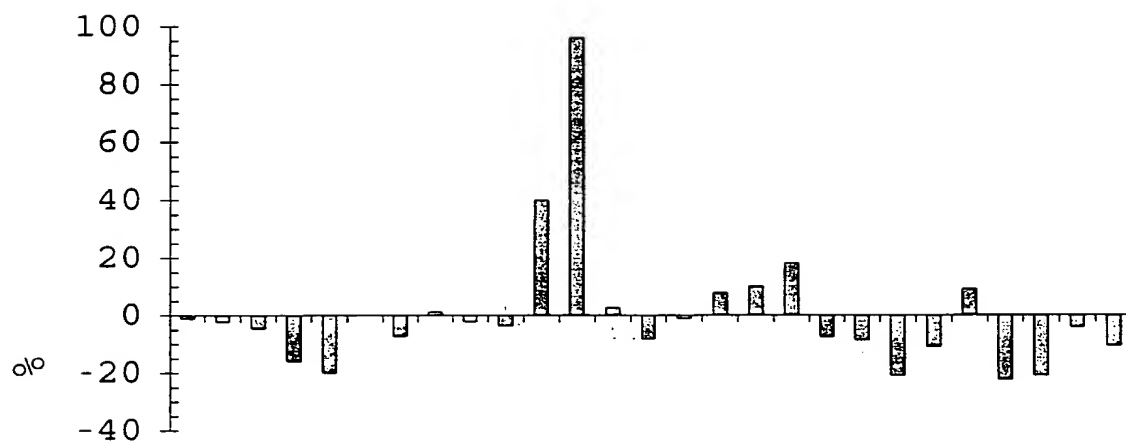


FIGURA 4

20
10
0
-10
-20

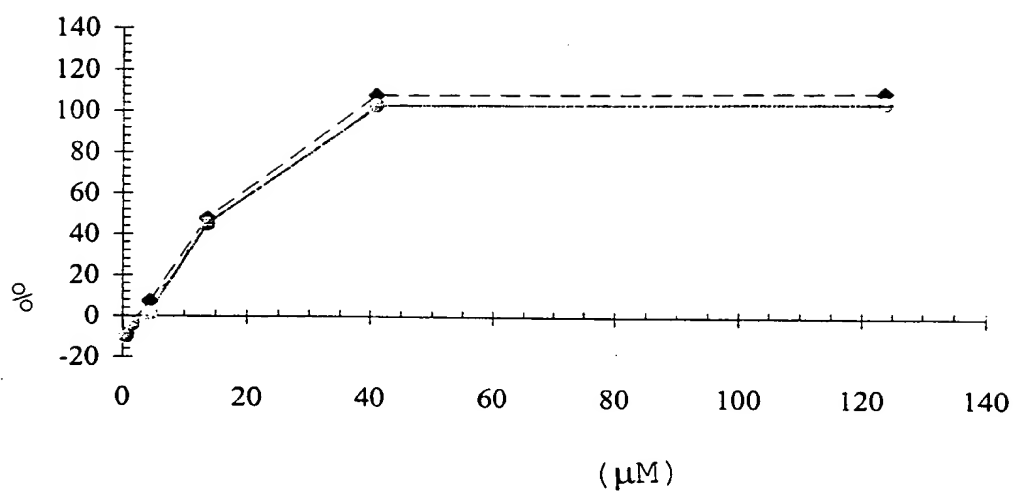


FIGURA 5

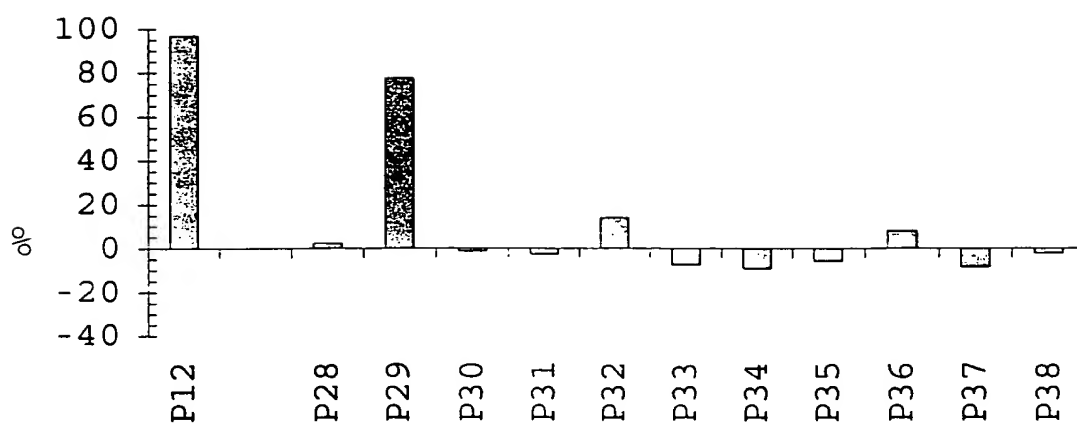


FIGURA 6

11 23

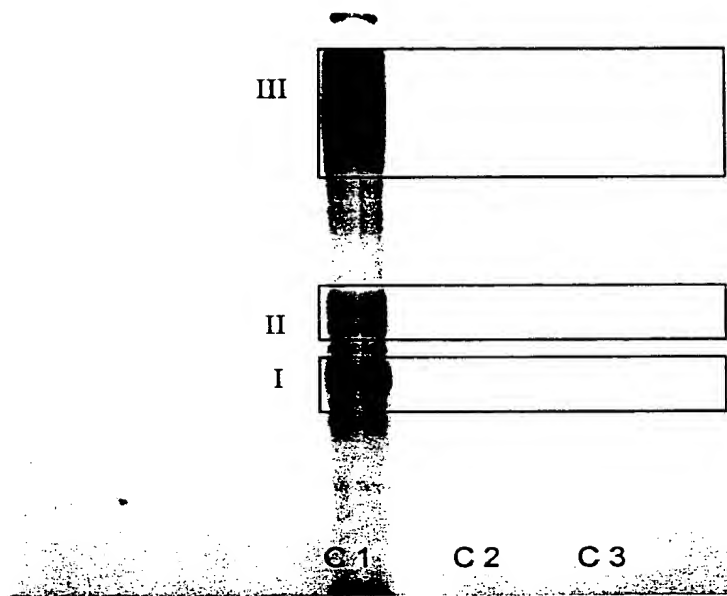


FIGURA 7

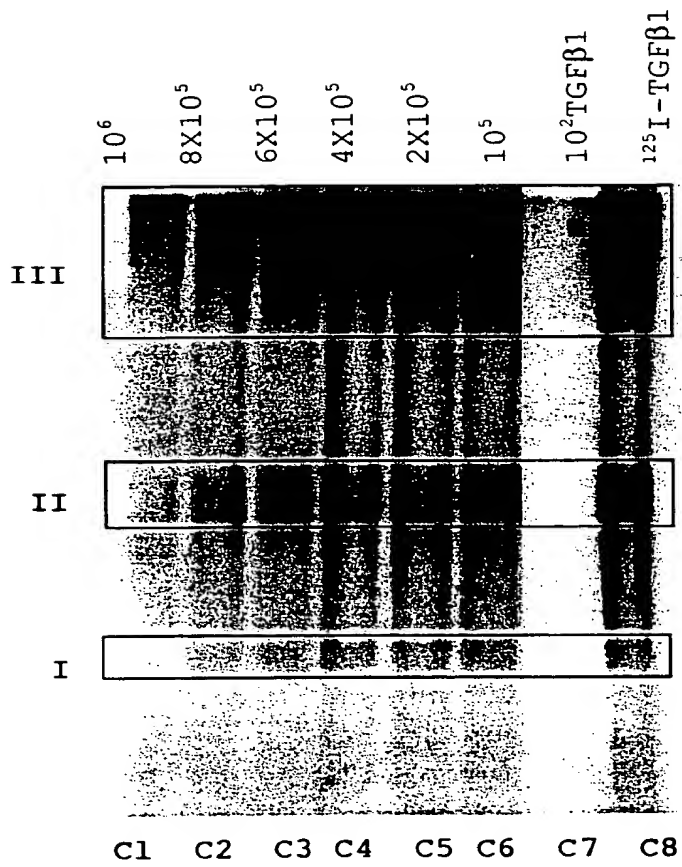


FIGURA 8

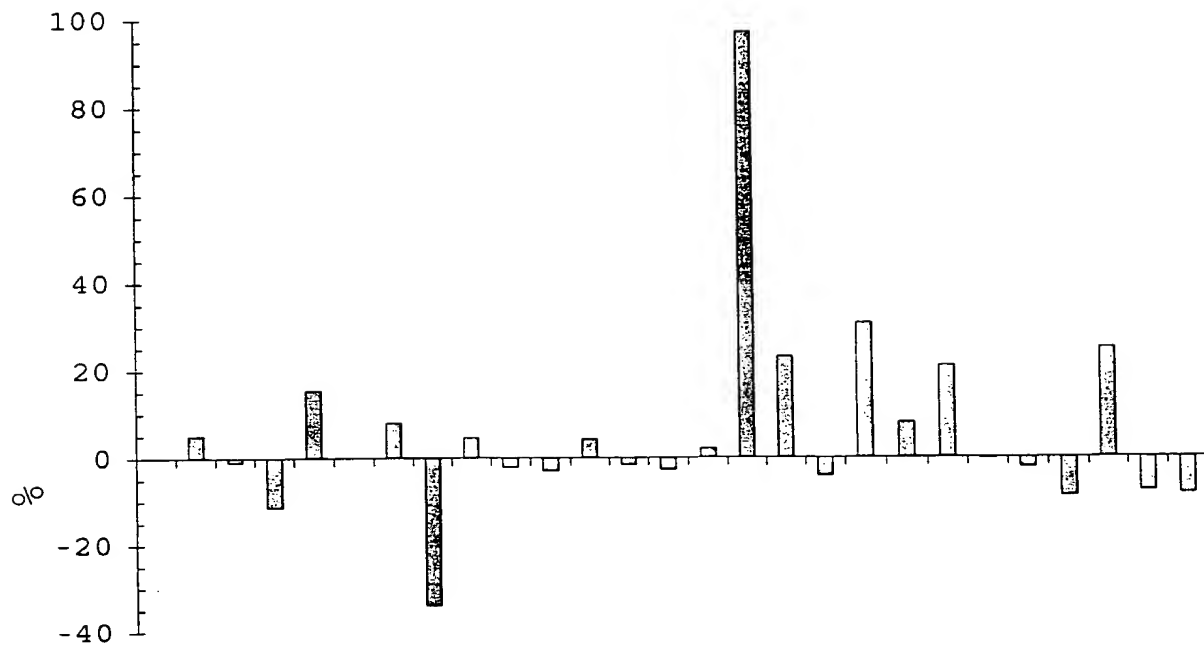


FIGURA 9

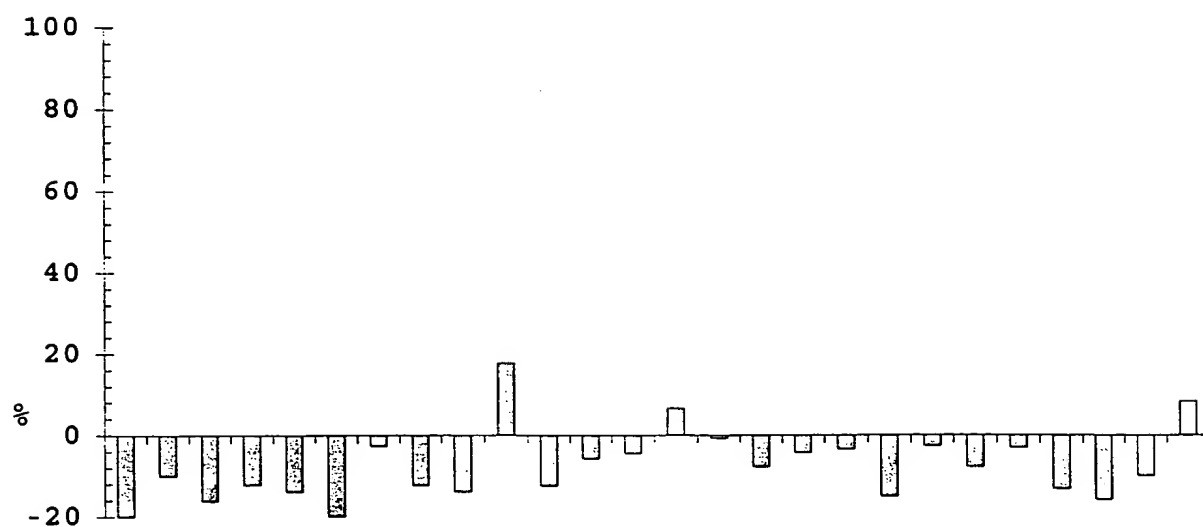


FIGURA 10

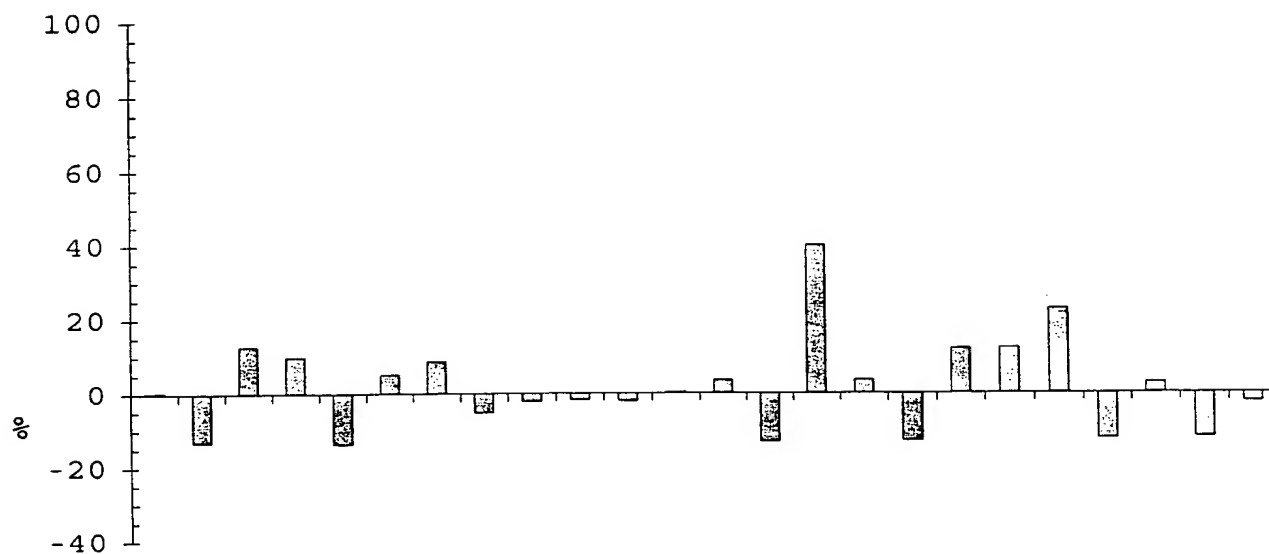


FIGURA 11

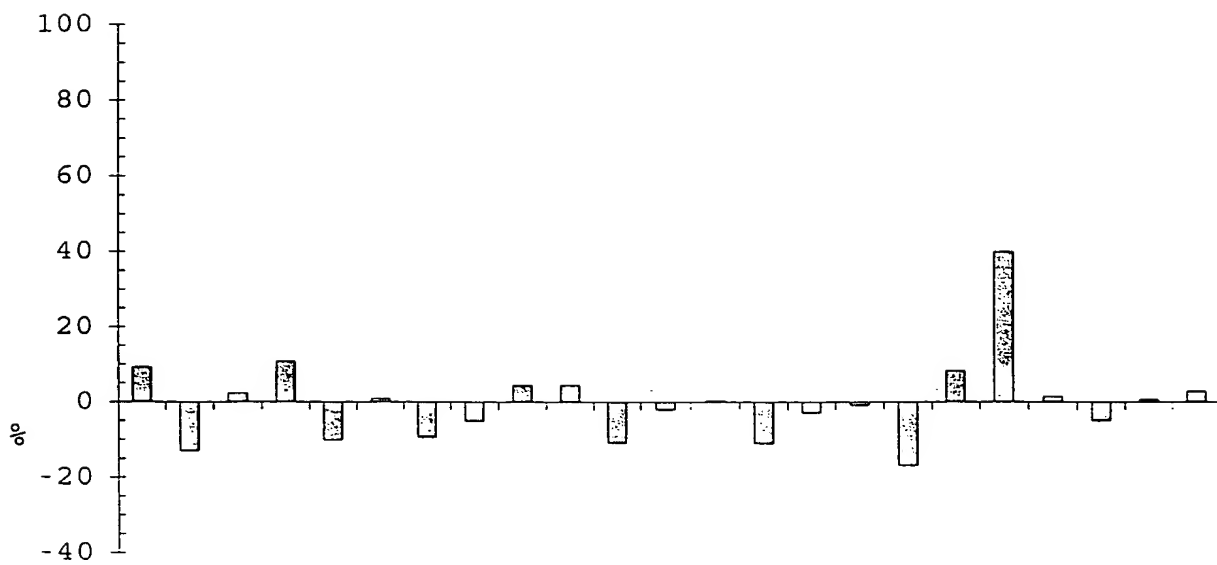


FIGURA 12

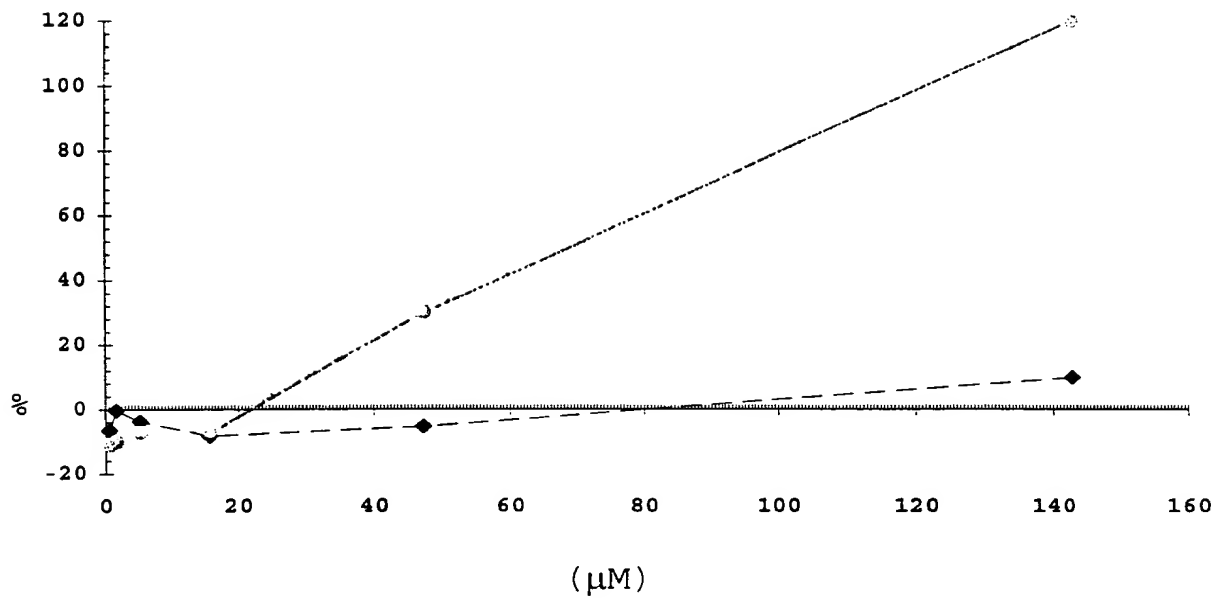


FIGURA 13

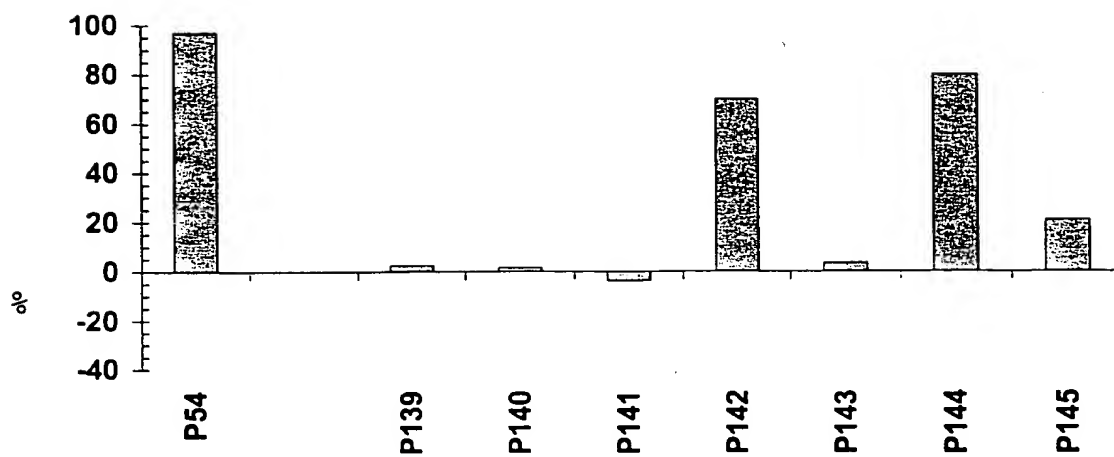


FIGURA 14

THIS PAGE BLANK (USPTO)

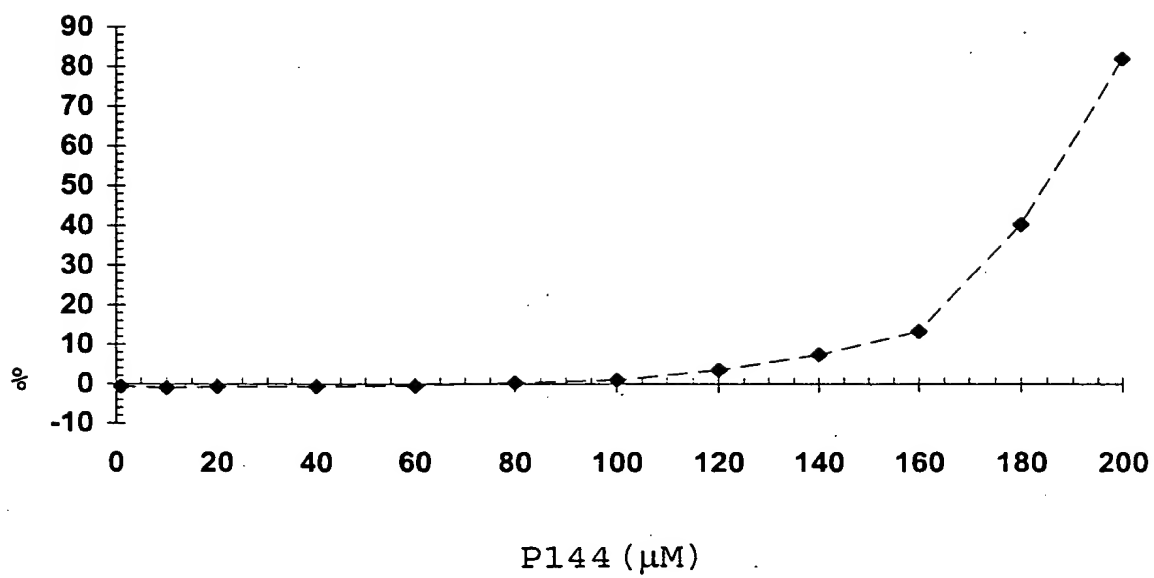


FIGURA 15

THIS PAGE BLANK (USPTO)

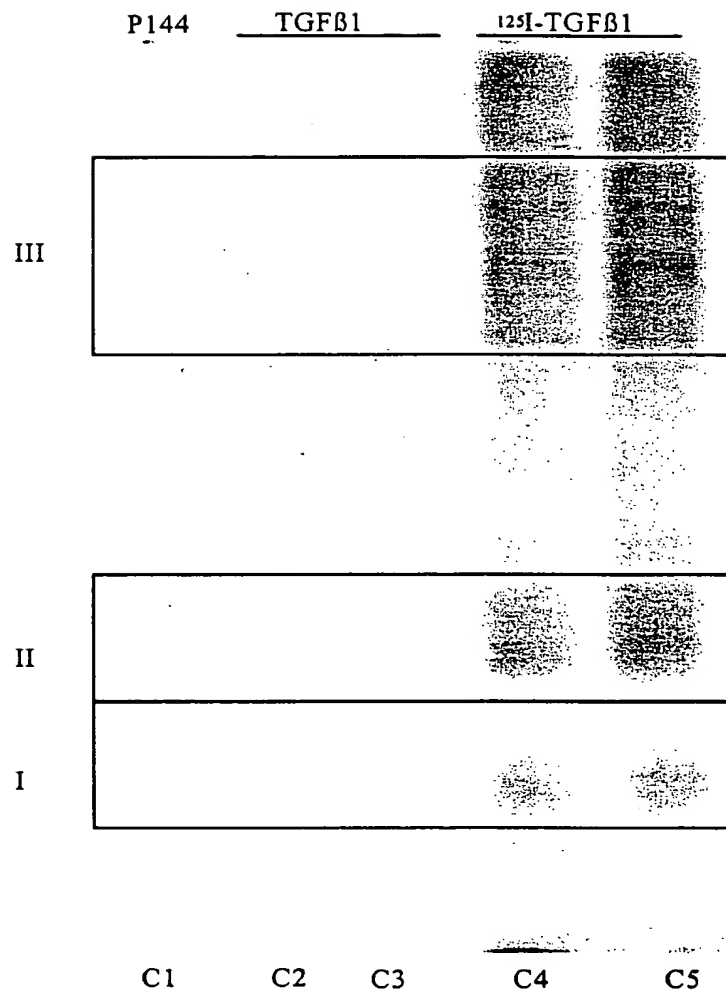


FIGURA 16

THIS PAGE BLANK (USPTO)

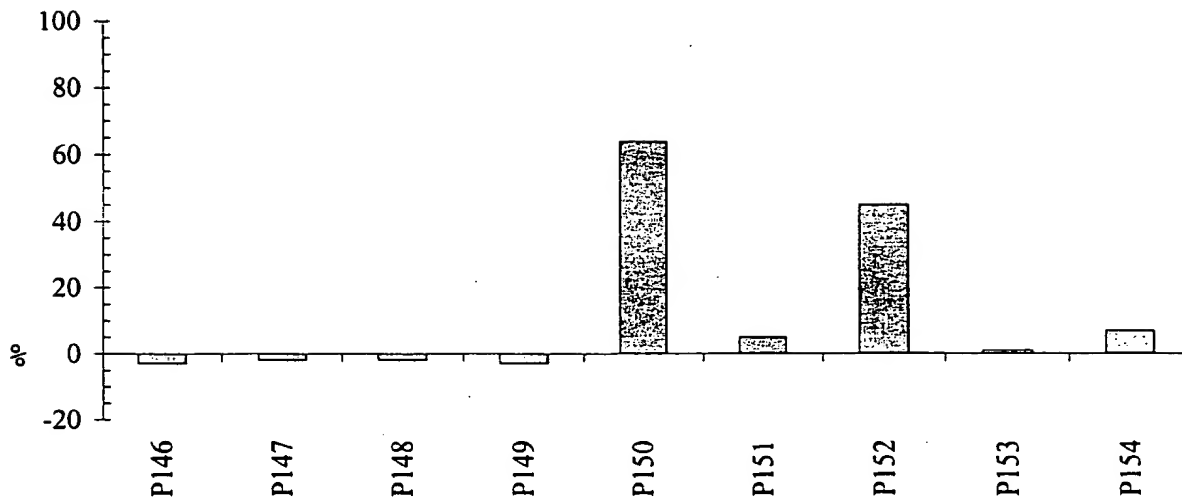


FIGURA 17

THIS PAGE BLANK (USPTO)

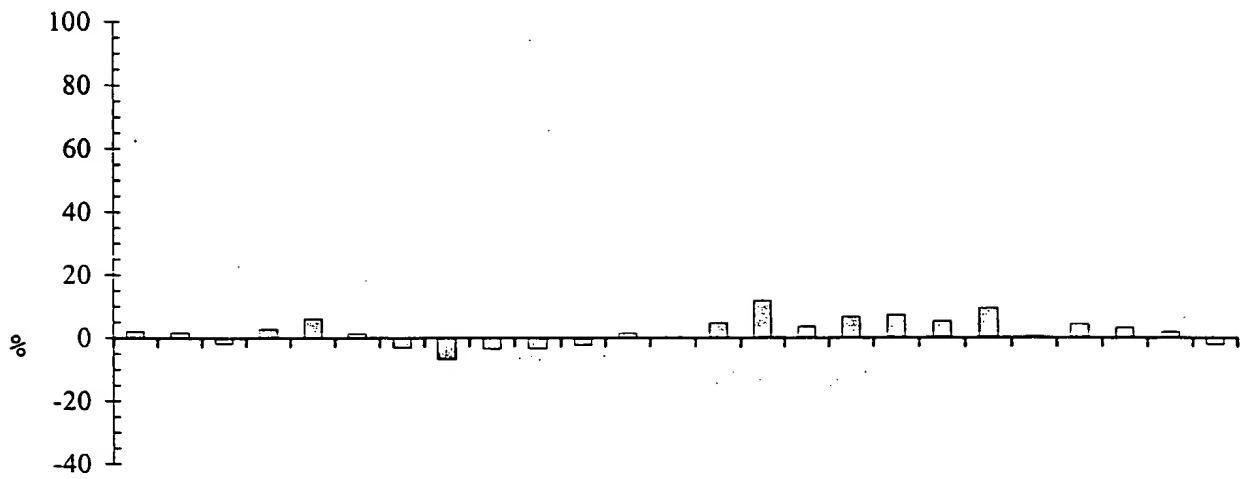


FIGURA 18

THIS PAGE BLANK (USPTO)

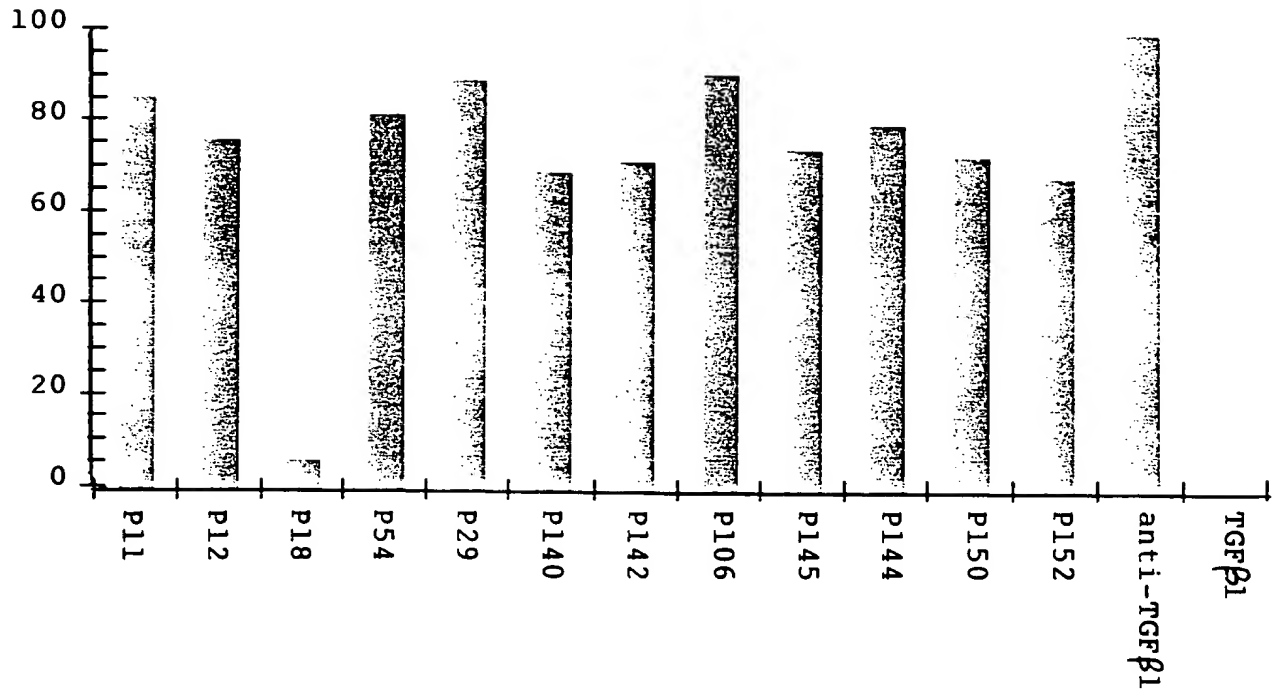


FIGURA 19

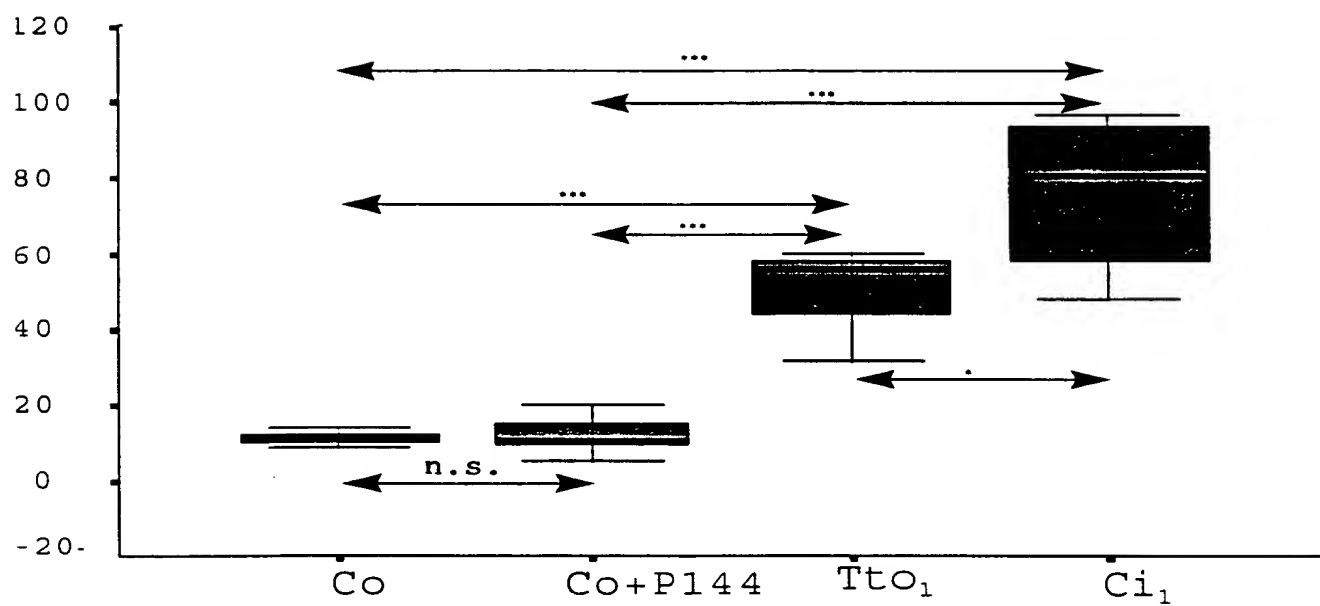


FIGURA 20

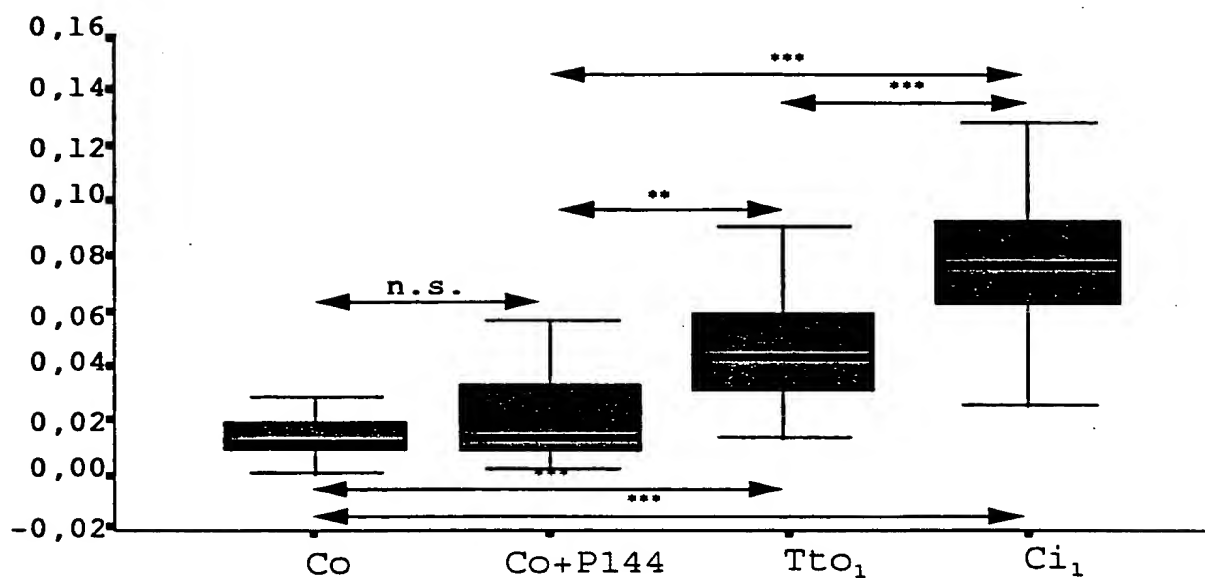


FIGURA 21

THIS PAGE BLANK (USPTO)

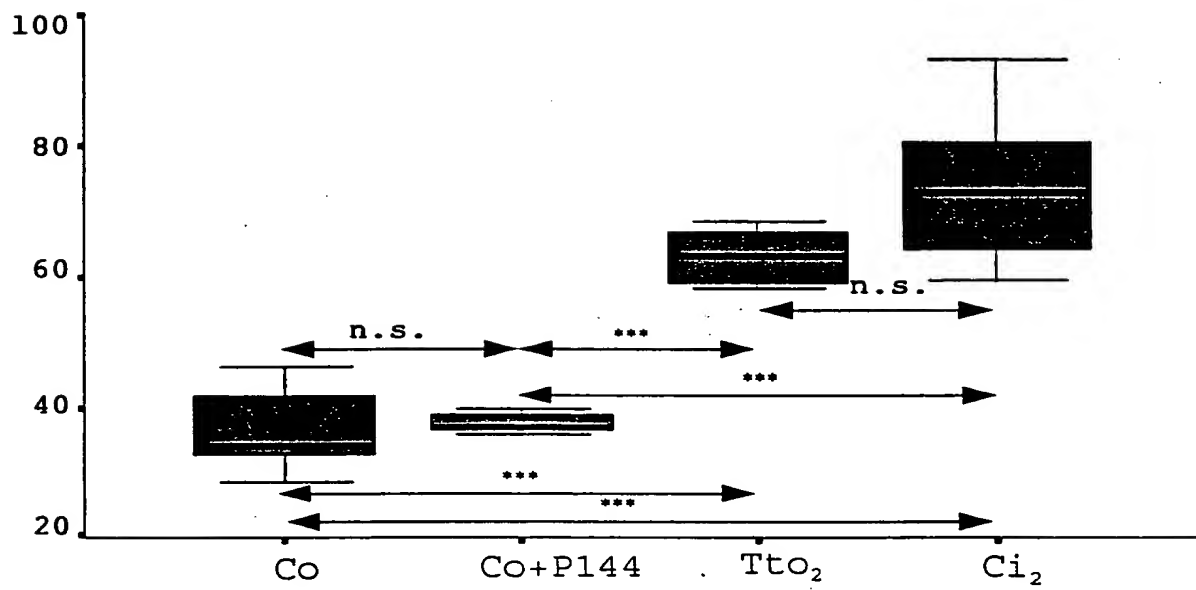


FIGURA 22

THIS PAGE BLANK (USPTO)

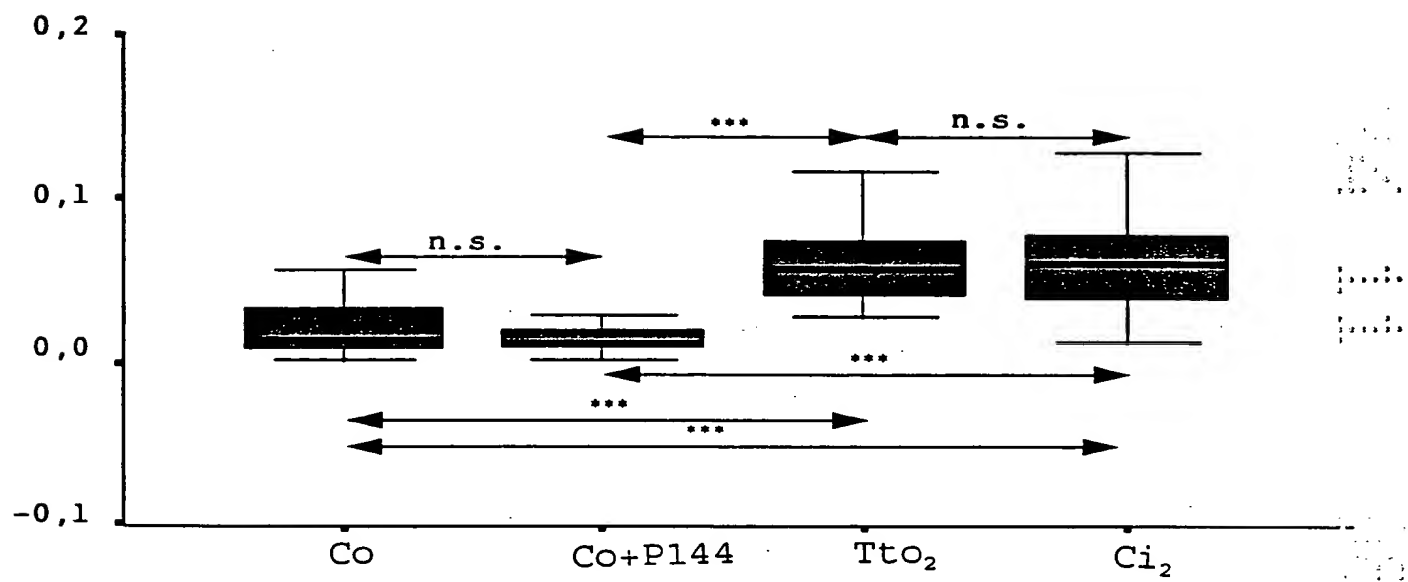


FIGURA 23

THIS PAGE BLANK (USPTO)

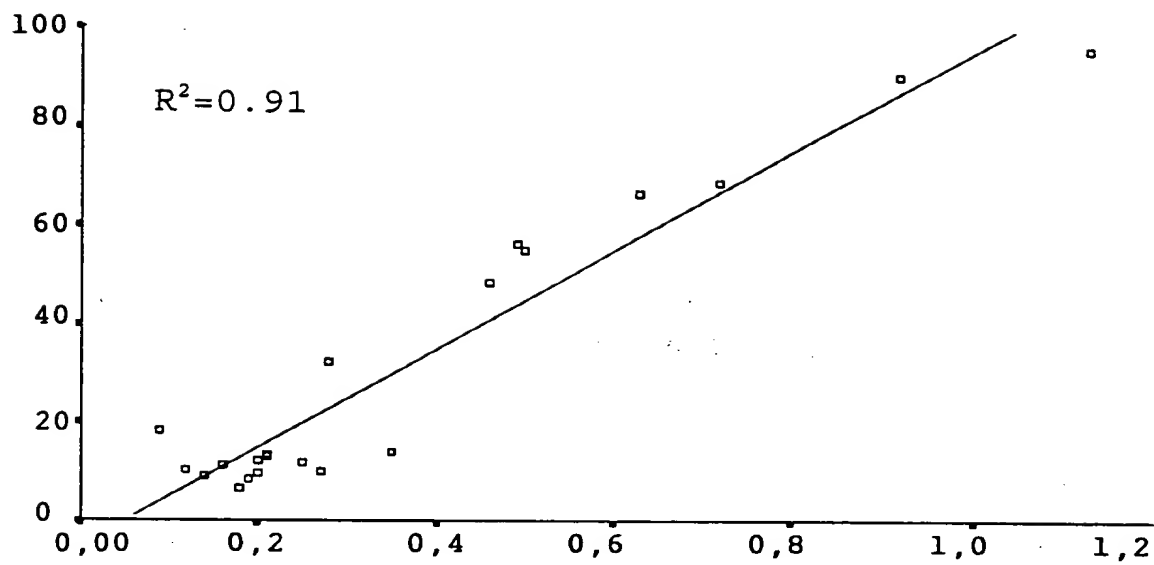


FIGURA 24

THIS PAGE BLANK (USPTO)

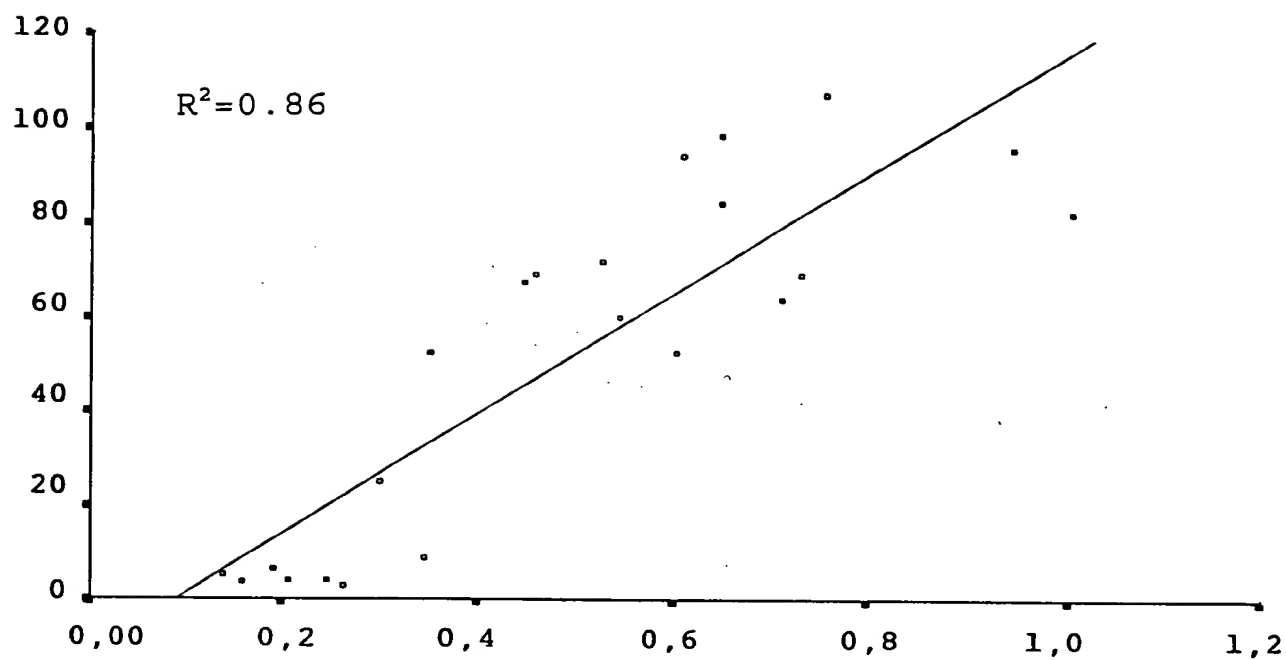


FIGURA 25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

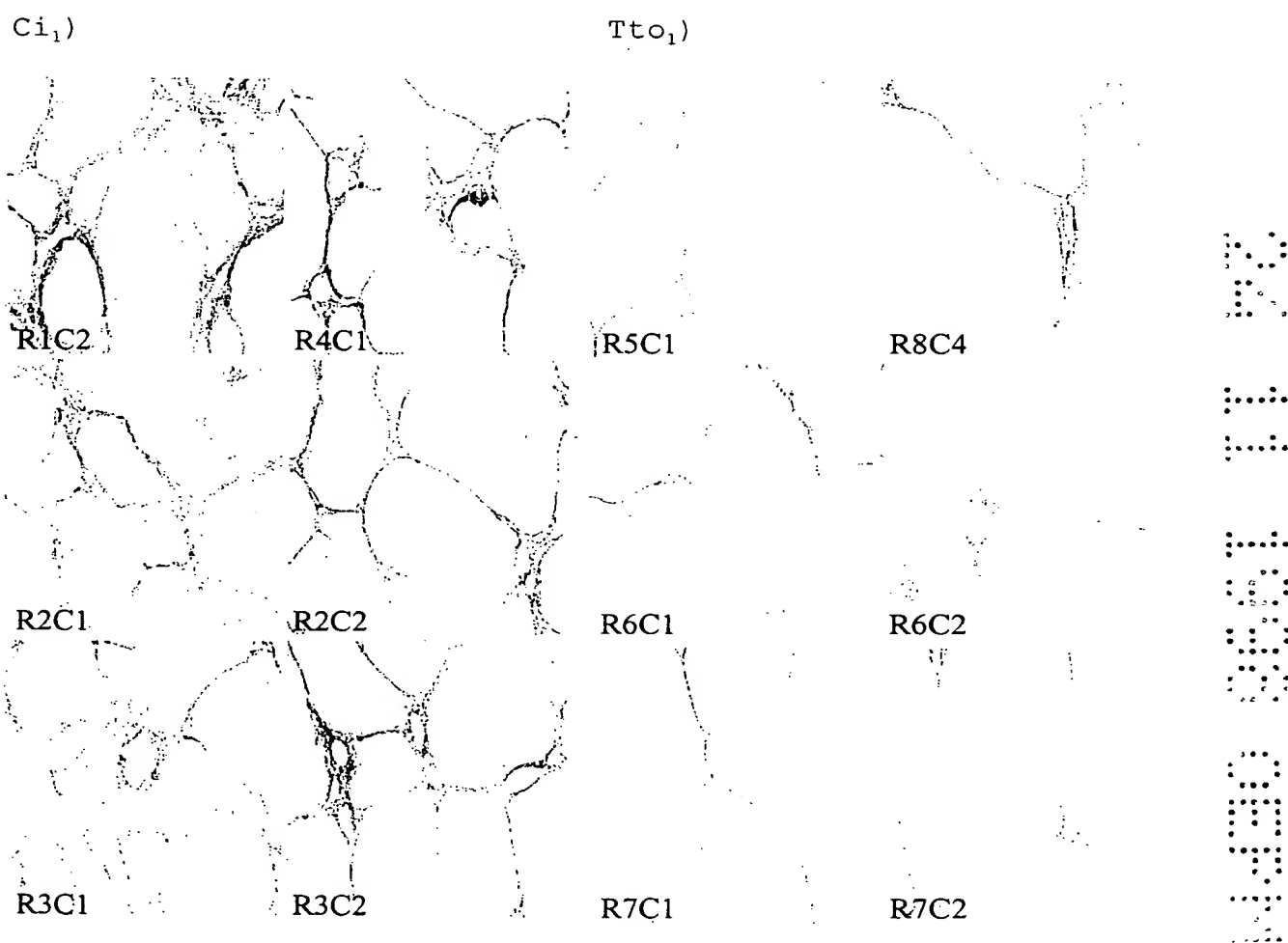


FIGURA 26

Ci₁)

Tto₁)

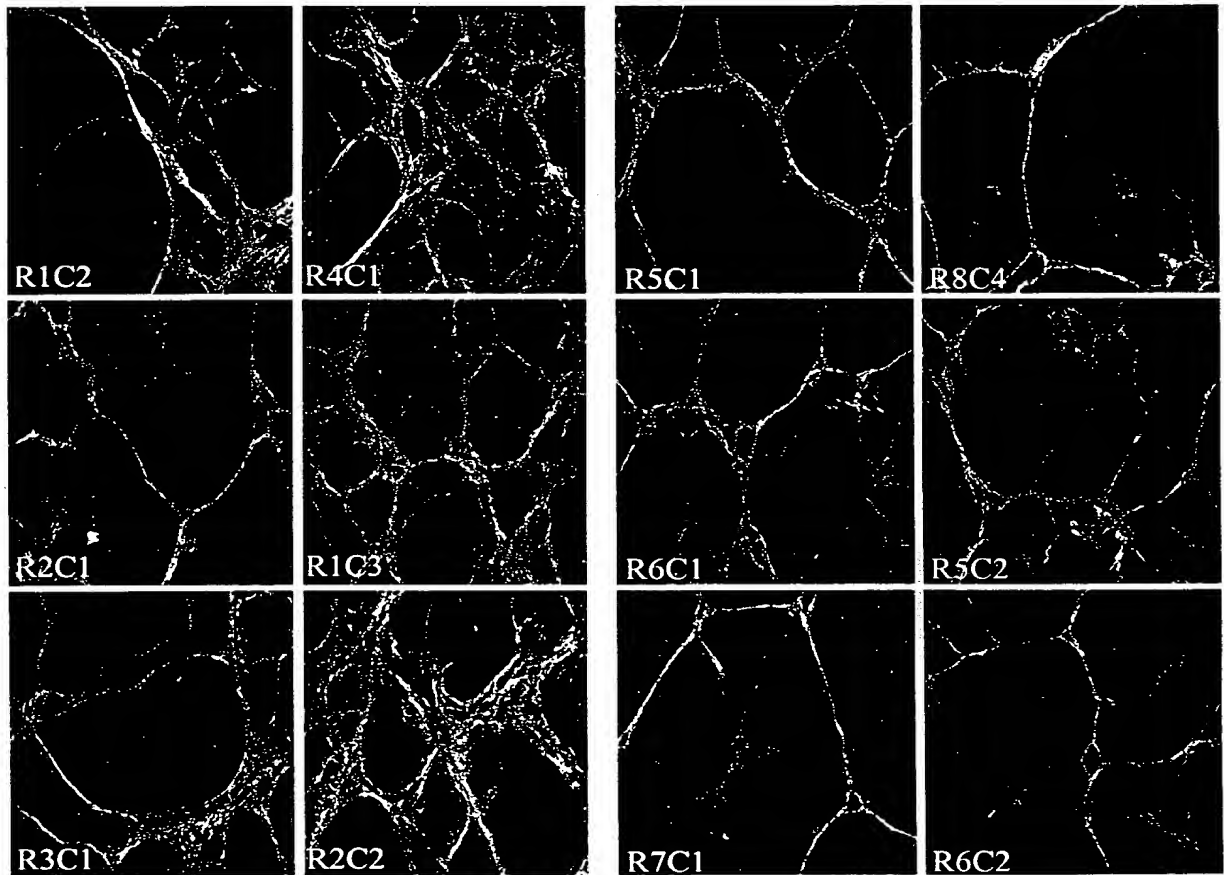


FIGURA 27

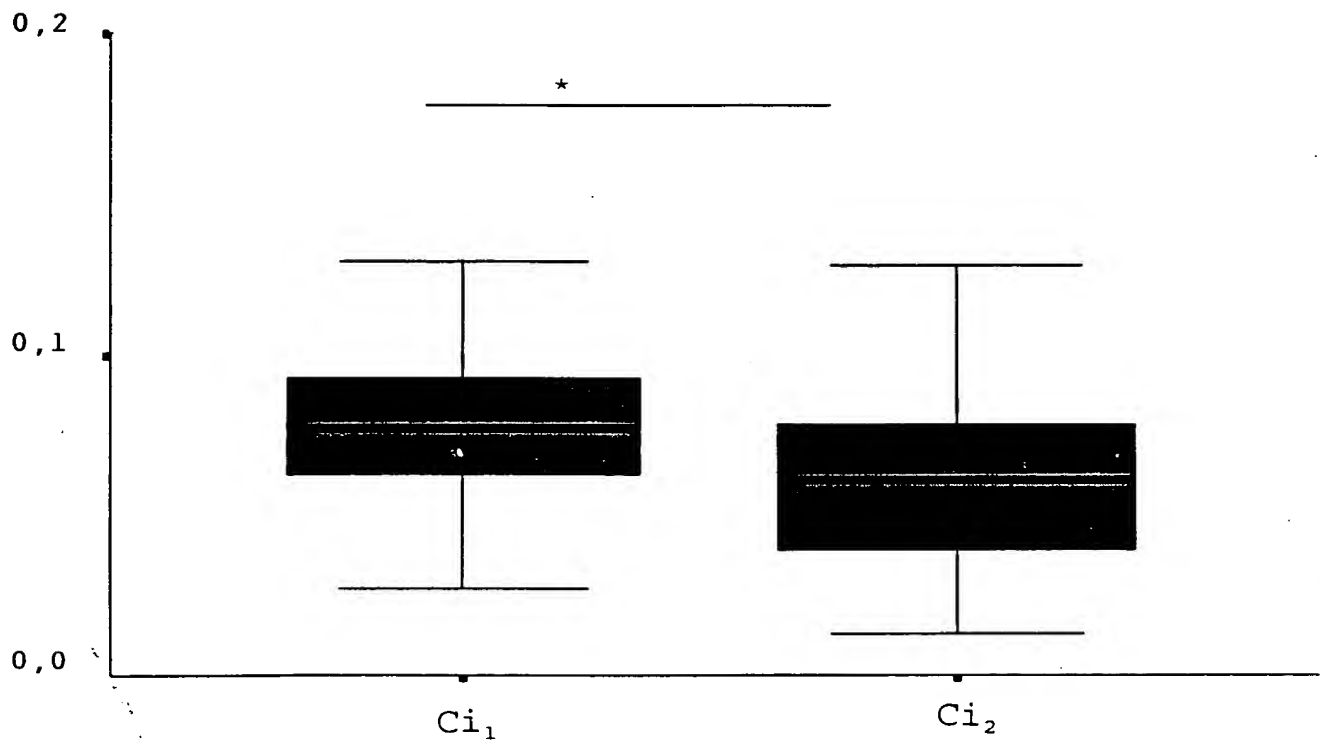


FIGURA 28

THIS PAGE BLANK (USPTO)